

Aus den  
DRK Kliniken Berlin | Westend  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Heribert Kantenich  
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Chefarzt: Dr. med. Arpad von Moers

Habilitationsschrift

# **Fibrogenese und Fibrolyse bei der Muskeldystrophie Typ Duchenne**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Arpad von Moers**  
geboren am 12.10.1957 in Marburg / Lahn

**Eingereicht:** Dezember 2007

**1. Gutachter:** Prof. Dr. med. Eugen Boltshauser, Zürich

**2. Gutachter:** Prof. Dr. med. Florian Heinen, München

**Inhaltsverzeichnis**

**Inhaltsverzeichnis ..... 1**

**1 Einleitung ..... 7**

1.1 Dystrophinopathien..... 8

1.2 Muskeldystrophie Duchenne ..... 10

1.2.1 Häufigkeit und klinische Symptomatik ..... 10

1.2.2 Diagnostik..... 12

1.2.3 Symptomatische Therapie ..... 15

1.2.4 Experimentelle Therapie..... 17

1.2.5 *DMD*-Gen ..... 19

1.2.6 Dystrophin und der Dystrophin-assoziierte Proteinkomplex ..... 20

1.2.7 Pathogenese ..... 23

1.3 Extrazelluläre Matrix ..... 25

1.3.1 Komponenten der extrazellulären Matrix ..... 25

1.3.2 Stoffwechsel und Funktion der extrazellulären Matrix ..... 27

1.3.3 Erkrankungen der extrazellulären Matrix ..... 29

1.3.4 Extrazelluläre Matrix und Muskeldystrophie Typ Duchenne ..... 30

1.4 Tiermodelle der Dystrophinopathie..... 32

1.5 Ziel der Arbeit ..... 34

**2 Patienten ..... 36**

2.1 Immunhistochemische Untersuchungen..... 36

2.2 Westernblot und Zymographie ..... 38

2.3 *In situ*-Hybridisierung und quantitative mRNA-Bestimmung ..... 40

2.4 Serologische Untersuchungen ..... 43

**3 Material und Methoden ..... 47**

3.1 Material..... 47

3.1.1 Muskelgewebe..... 47

3.1.2 Serum..... 47

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.2      | Methoden .....                          | 48        |
| 3.2.1    | Immunhistochemie .....                  | 48        |
| 3.2.2    | Westernblot .....                       | 50        |
| 3.2.3    | Zymographie .....                       | 52        |
| 3.2.4    | <i>In situ</i> -Hybridisierung.....     | 53        |
| 3.2.5    | Quantitative mRNA-Bestimmung.....       | 59        |
| 3.2.6    | Serologische Untersuchungen .....       | 63        |
| 3.2.7    | Statistische Analyse .....              | 64        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse .....</b>                 | <b>65</b> |
| 4.1      | Immunhistochemische Untersuchungen..... | 65        |
| 4.1.1    | Kollagene und Glykoproteine .....       | 65        |
| 4.1.2    | Desmin, Vimentin, NCAM.....             | 68        |
| 4.1.3    | MMP-1 .....                             | 70        |
| 4.1.4    | MMP-2.....                              | 70        |
| 4.1.5    | TIMP-1.....                             | 71        |
| 4.1.6    | TIMP-2.....                             | 72        |
| 4.2      | Westernblot .....                       | 73        |
| 4.2.1    | MMP-1 .....                             | 73        |
| 4.2.2    | MMP-2.....                              | 74        |
| 4.2.3    | TIMP-1.....                             | 75        |
| 4.3      | Zymographie .....                       | 76        |
| 4.4      | <i>In situ</i> -Hybridisierung.....     | 78        |
| 4.4.1    | Prokollagen I .....                     | 78        |
| 4.4.2    | Prokollagen IV .....                    | 81        |
| 4.4.3    | MMP-1 .....                             | 84        |
| 4.4.4    | MMP-2.....                              | 86        |
| 4.4.5    | TIMP-1.....                             | 88        |
| 4.4.6    | TIMP-2.....                             | 90        |
| 4.5      | Quantitative mRNA-Bestimmung.....       | 92        |
| 4.5.1    | MMP-1 .....                             | 93        |

---

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 4.5.2    | MMP-2.....  | 94         |
| 4.5.3    | TIMP-1.....                                       | 95         |
| 4.5.4    | TIMP-2.....                                       | 96         |
| 4.5.5    | TGF- $\beta$ 1 .....                              | 97         |
| 4.5.6    | HPRT.....   | 98         |
| 4.5.7    | MMP-1/TIMP-1 .....                                | 99         |
| 4.6      | Serologische Untersuchungen .....                 | 100        |
| 4.6.1    | Serumwerte von Kollagen I und Kollagen III.....   | 100        |
| 4.6.2    | Serumwerte von Kollagen VI .....                  | 100        |
| 4.6.3    | Serumwerte von Laminin P1 .....                   | 102        |
| 4.6.4    | Serumwerte von Tenascin.....                      | 102        |
| 4.6.5    | Serumwerte von TIMP-1.....                        | 103        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion .....</b>                           | <b>104</b> |
| 5.1      | Kollagene und nicht-kollagene Glykoproteine ..... | 106        |
| 5.2      | MMP-1 .....                                       | 109        |
| 5.3      | MMP-2.....  | 111        |
| 5.4      | TIMP-1 und TIMP-2 .....                           | 113        |
| 5.5      | TGF- $\beta$ 1 .....                              | 114        |
| 5.6      | Serologie .....                                   | 115        |
| 5.7      | Befunde bei anderen Myopathien.....               | 117        |
| 5.8      | Proliferation und Differenzierung .....           | 119        |
| <b>6</b> | <b>Zusammenfassung.....</b>                       | <b>124</b> |
| <b>7</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>                 | <b>126</b> |
| <b>8</b> | <b>Danksagung.....</b>                            | <b>162</b> |

**Abkürzungen**

---

|          |   |
|----------|---|
| AD       | autosomal dominant  |
| ADAM     | a disintegrin and metalloprotease                           |
| AK       | Antikörper  |
| AMPA     | 4-amino-phenylmercuric acetate                              |
| APAAP    | Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase          |
| AR       | autosomal rezessiv  |
| ATP      | Adenosintriphosphat   |
| bFGF     | basic fibroblast growth factor                              |
| BMD      | Muskeldystrophie Becker                                     |
| CK       | Kreatinkinase   |
| CMD      | kongenitale Muskeldystrophie                                |
| cxmd     | canine x-linked muscular dystrophy (GRMD)                   |
| CTP      | Cytosintriphosphat  |
| DAP      | Dystrophin assoziierter Proteinkomplex                      |
| DEPC     | Diethylpyrocarbonat   |
| DM       | Dermatomyositis   |
| DMD      | Muskeldystrophie Duchenne                                   |
| DTT      | Dithiothreitol  |
| ECM      | extrazelluläre Matrix                                       |
| Eco RI   | Escherichia coli, Stamm Ry13                                |
| EGF      | epidermal growth factor                                     |
| Ex       | Exon  |
| FACIT    | fibril-associated collagens with interrupted triple helices |
| FCS      | fetal calf serum  |
| FGF      | fibroblast growth factor                                    |
| GRMD     | Golden Retriever Muskeldystrophie                           |
| GTP      | Guanintriphosphat   |
| hfmd     | hypertrophic feline muscular dystrophy                      |
| Hind III | Haemophilus influenzae, Stamm Rd                            |

---

|          |   |
|----------|---|
| HPRT     | Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase           |
| IGF      | insulin growth factor                           |
| IQ       | Intelligenzquotient                             |
| IH       | Immunhistochemie                                |
| IL       | Interleukin                                     |
| ISH      | <i>In situ</i> -Hybridisierung                  |
| KDa      | Kilodalton                                      |
| Kol      | Kollagen  |
| LARGE    | acetylglucosaminyltransferase-like protein      |
| LGMD     | Gliedergürtelmuskeldystrophie                   |
| LIMP     | large inhibitor of metalloproteinase            |
| LNGFR    | low-affinity nerve growth factor                |
| MDC      | kongenitale Muskeldystrophie                    |
| mdx Maus | x-chromosomale Muskeldystrophie der Maus        |
| MMP      | Matrix Metalloproteinase                        |
| mRNA     | messenger RNA                                   |
| MT-MMP   | membrane type of matrix metalloproteinase       |
| tRNA     | transfer RNA                                    |
| Myf      | myogenic transcription factor                   |
| nNOS     | neuronale Stickoxid Synthase                    |
| PAG      | Polyacrylamidgel                                |
| PBS      | phosphat buffered saline                        |
| PCR      | polymerase chain reaction                       |
| PDGF     | platelet derived growth factor                  |
| PG       | Proteoglykane                                   |
| PICP     | Prokollagen I                                   |
| PIIINP   | Prokollagen III                                 |
| PM       | Polymyositis                                    |
| RT-PCR   | reverse transcriptase-polymerase chain reaction |
| SMA      | spinale Muskelatrophie                          |

|                |                                       |
|----------------|---------------------------------------|
| TES            | Tris-HCL/EDTA/NaCl                    |
| TGF- $\beta$ 1 | transforming growth factor- $\beta$ 1 |
| TIMP           | tissue inhibitor of metalloproteinase |
| TNF- $\alpha$  | Tumornekrosefaktor- $\alpha$          |
| WB             | Westernblot                           |

---

“Fibrosis may only be a secondary consequence of the initial necrosis of the muscle fibres but its importance in the natural history of muscular dystrophy can probably not be overestimated. A greater knowledge of the exact cellular causes and the control of fibrosis in skeletal muscle could be extremely important in guiding the success of future therapeutic approaches.“ [74]

## 1 Einleitung

Muskeldystrophien sind die häufigsten neuromuskulären Krankheiten des Kindes- und Jugendalters [95]. Es handelt sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die sich hinsichtlich des Manifestationsalters, des klinischen Erscheinungsbildes, der Progredienz und des Erbganges unterscheiden (Klassifikation bei [172]). Die Muskeldystrophien vom Typ Duchenne (DMD) und Becker (BMD) sind verursacht durch Mutationen im *DMD*-Gen [232,181], die in der Regel bei der schweren Verlaufsform DMD zu einem Verlust des Proteins und bei der milden Verlaufsform BMD zu einer Verkürzung und quantitativen Reduktion des Proteins Dystrophin führen [148,182]. Die Identifikation des Dystrophins führte zur Entdeckung des Dystrophin-assoziierten Proteinkomplexes (DAP) [52,161,101] eines transmembranösen Komplexes, der die extrazelluläre Matrix (ECM) mit dem intrazellulär gelegenen kontraktilen Apparat verbindet. Mutationen in Genen, die verschiedene Komponenten dieses DAP wie z. B. die Sarkoglykane kodieren, führen zu den so genannten Gliedergürtelmuskeldystrophien (LGMD). Andere LGMD werden durch Mutationen in Genen für Intermediärfilamente (Desmin, Dysferlin, Telethonin) oder für Kernproteine wie dem Emerin verursacht [102,37,132]. Die wahrscheinlich häufigste kongenitale Muskeldystrophie (CMD) beruht auf Mutationen des *LAMA2* Gens, welches die Laminin- $\alpha$ 2-Kette des Basalmembran ständigen ECM Proteins Laminin2 kodiert (MDC 1A) [317,143]. Laminin2 ist über  $\alpha$ -Dystroglykan mit



---

dem DAP verbunden. Eine sekundäre Defizienz von  $\alpha$ -Dystroglykan und damit eine Störung im transmembranösen Proteinkomplex besteht auch bei einer Gruppe kongenitaler Muskeldystrophien, die durch Mutationen in Genen bedingt sind, die in die O-Glykosylierung involviert sind (Walker-Warburg-Syndrom, Fukuyama CMD, Muscle-eye-brain-disease, MDC1C, MDC1D) [218]. Die CMD Typ Ullrich wird durch Mutationen im Gen für das basalmembranständige Kollagen VI verursacht [51]. Allerdings ist in den letzten Jahren auch deutlich geworden, dass Mutationen in einem Gen sowohl zu einem CMD Phänotyp als auch zu einem LGMD Phänotyp führen können [132,218].

## 1.1 Dystrophinopathien

Die DMD gehört zu den Dystrophinopathien, einer Gruppe von Erkrankungen, die durch Mutationen im *DMD*-Gen verursacht werden. Das klinische Spektrum reicht von der asymptomatischen CK-Erhöhung [25,66], über eine Kardiomyopathie [318,238], eine Quadriceps Myopathie [310], eine Myopathie mit Belastungsintoleranz und Rhabdomyolyse [106] oder mit Muskelkrämpfen [123], bis zur kongenitalen Muskeldystrophie [263,13,70]. Die Kombination einer DMD mit einem Morbus Addison und einem Glycerokinasmangel wurde bei Mikrodeletionen der Region Xp21 beschrieben [308,279]. Ein sehr ungewöhnlicher Phänotyp lag bei einem Jungen mit einer Dystrophinopathie vor, der mit einer schweren globalen Retardierung, einer Epilepsie, endokrinologischen Auffälligkeiten und einer massiven Makroglossie auffiel [333].

---

Klinische Klassifikation der Dystrophinopathien:

Kongenitale Muskeldystrophie

Muskeldystrophie Typ Duchenne

Muskeldystrophie Typ Becker

Kardiomyopathie

Myopathie mit Muskelkrämpfen

Belastungsabhängige Rhabdomyolyse und Belastungsintoleranz

Muskeldystrophie mit Morbus Addison und Glycerokinasemangel

Symptomatische Konduktorinnen

Mädchen mit Turner-Syndrom oder X;autosomaler Translokation

Asymptomatische CK-Erhöhung

Die klinische Variabilität zwischen den klassischen Verlaufsformen DMD und BMD stimmt bei ca. 90% der Patienten mit der Art der Mutation im *DMD*-Gen überein. Entscheidend ist, ob die Mutation zu einer Verschiebung des Leserahmens (out of frame) führt [182,25]. Mutationen, die den Leserahmen verschieben, führen zu einer DMD mit hochgradigem Dystrophinmangel (<5 %), Mutationen, bei denen der Leserahmen erhalten bleibt (in frame), zu einer BMD mit geringerer Reduktion des Dystrophins an der Muskelzellmembran. Ausnahmen von der Leserahmen-Hypothese weisen darauf hin, dass nicht nur die Menge des noch vorhandenen Dystrophins den Phänotyp bestimmt. Diese Ausnahmen treten vermehrt bei Mutationen im N-terminalen Abschnitt des *DMD*-Gens bis zum Exon 13 auf [237], besonders häufig bei Mutationen der Exons 3-7 [206]. Entspricht der Phänotyp nicht der Leserahmen-Hypothese, muss auch an modifizierende Faktoren gedacht werden. Kerst et al. konnten bei einem Patienten mit einer In-frame-Deletion und ungewöhnlich schwerem Phänotyp eine weitere Mutation im *Myf-6*-Gen nachweisen, das einen myogenen Transkriptionsfaktor kodiert [174]. Bei Patienten mit isolierter Kardiomyopathie konnte die Inaktivierung des Muskelpromotors nachgewiesen werden, die an der Skelettmuskulatur durch Hochregulation des C/B- und P-

---

Promotors kompensiert werden kann [318,238]. Bei den Jungen mit kongenitaler Manifestation der DMD wurden z.T. modifizierende Zweiterkrankungen nachgewiesen [263,13,229], die die frühe Manifestation erklären können.

22 % der Konduktorinnen sind symptomatisch. 17 % haben eine sehr variabel ausgeprägte, proximal betonte Muskelschwäche z. T. mit Muskelkrämpfen und belastungsabhängigen Muskelschmerzen. 8 % haben zusätzlich oder als einziges Symptom eine dilatative Kardiomyopathie. Eine asymptomatische Erweiterung des linken Ventrikels wurde sonographisch bei weiteren 18 % der Konduktorinnen nachgewiesen [152]. Ein wichtiger pathogenetischer Faktor ist die ungleiche X-Inaktivierung, die alleine die Ausprägung des Phänotyps jedoch nicht erklärt [15,196].

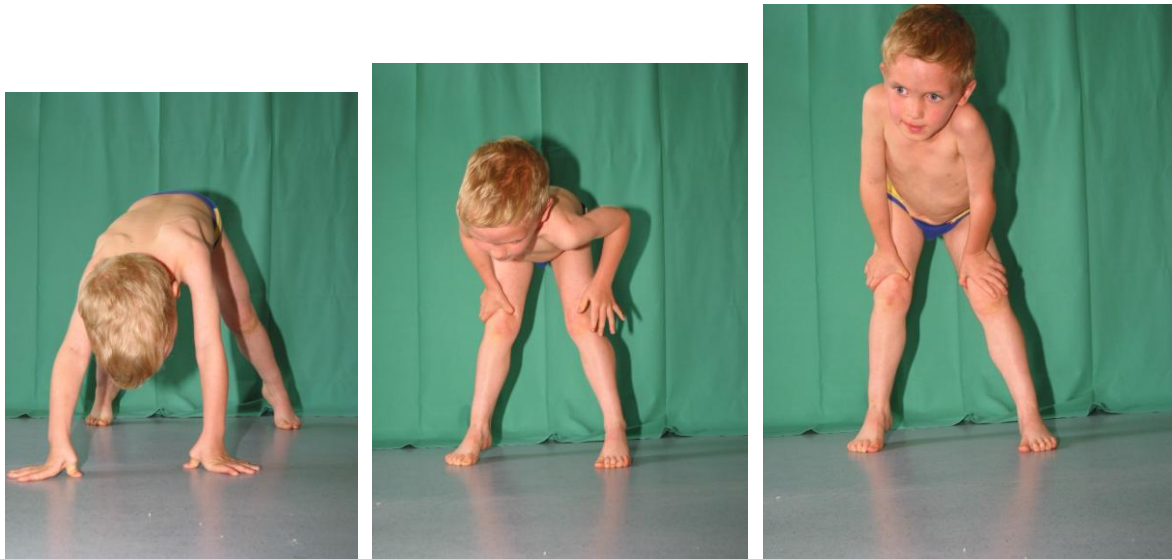
## **1.2 Muskeldystrophie Duchenne**

### **1.2.1 Häufigkeit und klinische Symptomatik**

Die X-chromosomal-rezessiv vererbte DMD ist die mit Abstand häufigste Muskelerkrankung im Kindesalter. Es sind 1:3.500 männliche Neugeborene betroffen [95]. Die Rate von Neumutationen liegt bei 1:10.000 Keimzellen. Für die zweithäufigste Dystrophinopathie, die BMD, wird eine Inzidenz von ca. 1:18.500 Neugeborene angenommen [48].

Eine verzögerte statomotorische Entwicklung fällt bei 50 % der Jungen mit DMD auf. Zwischen dem 2. - 5. Lebensjahr entwickelt sich das charakteristische pendelnde Gangbild mit Hyperlordose, Schwierigkeiten beim Rennen und Treppensteigen. Derbe muskuläre Pseudohypertrophien treten an den Waden auf, sie können aber auch die gluteale Muskulatur, den M. quadriceps vastus lateralis, den M. deltoideus oder den M. masseter betreffen. Die Muskelschwäche ist symmetrisch. Sie beginnt proximal meist am Beckengürtel, seltener am Schultergürtel. Besonders betroffen sind die Mm. glutei, der M. iliopsoas, M. quadriceps, M. pectoralis major, M.

brachioradialis, M. biceps brachii und M. triceps. Das Gowers-Manöver ist Ausdruck der Schwäche der Hüftstrecker (Abbildung 1.1) [295,97].



**Abbildung 1.1**

**5-jähriger Junge mit DMD mit positivem Gowers-Phänomen beim Aufrichten vom Boden als Ausdruck der Schwäche der Hüftstrecker.**

Es entwickelt sich ein charakteristisches Verteilungsmuster von Kontrakturen des M. rectus femoris, des M. tensor fasciae latae, der medialen Kniebeuger und der Achillessehne [275,108]. Von den distalen Muskelgruppen sind die Handgelenkstrecker stärker als die -beuger betroffen, der M. tibialis ant. und die Mm peronei mehr als der M. tibialis post. und der M. gastrocnemius. Die Funktion der externen Sphinkteren bleibt lange erhalten. Die von den Hirnnerven innervierten Muskeln sind mit Ausnahme ist der M. sternocleidomastoideus weniger betroffen [97]. Bemerkenswerterweise bleiben die externen Augenmuskeln ausgespart [171]. Die progrediente Muskelschwäche und die Kontrakturen führen zum Gehverlust um das 10.-12. Lebensjahr [19]. Nach dem Gehverlust nehmen die Beugekontrakturen an den Extremitäten zu, 90 % der Patienten bekommen eine progrediente Skoliose

---

[274,311]. Alle Patienten entwickeln eine restriktive Ventilationsstörung [17,215]. Die klinische Relevanz der Kardiomyopathie nimmt mit dem Lebensalter zu [72,178]. Im dritten Lebensjahrzehnt haben nahezu alle Patienten eine messbare kardiale Funktionsstörung. Schwere Kardiomyopathien treten besonders bei Deletionen der Exons 3-7 und 48-49 auf. Die respiratorische und/oder kardiale Insuffizienz führen ohne Einsatz einer maschinellen Beatmung um das 20. Lebensjahr zum Tod.

Der durchschnittliche IQ-Wert bei DMD-Patienten liegt signifikant unter dem von Normalkontrollen, 31 % der Jungen haben einen IQ von  $< 75$  [42]. Besonders betroffen sind die sprachlichen Fähigkeiten und Gedächtnisleistungen [42,31,71]. Mutationen in den C-terminalen Abschnitten des Gens gehen häufiger mit einer mentalen Retardierung einher [49]. Ein niedriger Wert auch im Handlungs-IQ korreliert mit der Makroglossie [42]. Die mentale Retardierung ist nicht progredient, die sprachlichen Fähigkeiten nehmen eher zu [295,71].

### 1.2.2 Diagnostik

Die Diagnose wird anhand der Familienanamnese (betroffene männliche Verwandte in der mütterlichen Familie), der klinischen Symptomatik und des Krankheitsverlaufs, der erhöhten Kreatinkinase-Aktivität im Serum, des molekulargenetischen Befundes und des Befundes der Muskelbiopsie gestellt. Mit der molekulargenetischen Standarddiagnostik werden ca. 98 % der Deletionen und Duplikationen erfasst [97,112]. Die aufwändige Suche nach Punktmutationen wird nicht routinemäßig durchgeführt. Wird bei der molekulargenetischen Untersuchung keine Mutation nachgewiesen oder ergibt sich eine Diskrepanz zwischen der Mutation und dem Phänotyp (DMD-Phänotyp bei einer 'in-frame' Mutation) muss eine Muskelbiopsie entnommen werden (Abbildung 1.2). Immunhistochemisch wird mit Antikörpern gegen verschiedene Epitope des Proteins das Fehlen bzw. die hochgradige Reduktion von Dystrophin (Abbildung 1.3), die Verminderung von  $\beta$ -Dystroglykan und anderen Komponenten des DAP sowie die Hochregulation von Utrophin

nachgewiesen (Abbildung 1.4) [36,247]. In unklaren Fällen kann mit dem Westernblot sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Analyse des Dystrophins ergänzt werden [97].

Hilfreich kann die Ableitung eines Elektroretinogramms sein. Bei einer verminderten Expression der Isoform Dp 260 (Dystrophinprotein) (siehe unter 1.2.5), ist die B-Welle abgeflacht oder negativ [260]. Bei der Pränataldiagnostik kann bei einem fehlenden Nachweis einer Mutation im *DMD*-Gen mittels der Haplotypisierung eine Mutation im Bereich des DMD Genorts weitgehend ausgeschlossen werden [272].

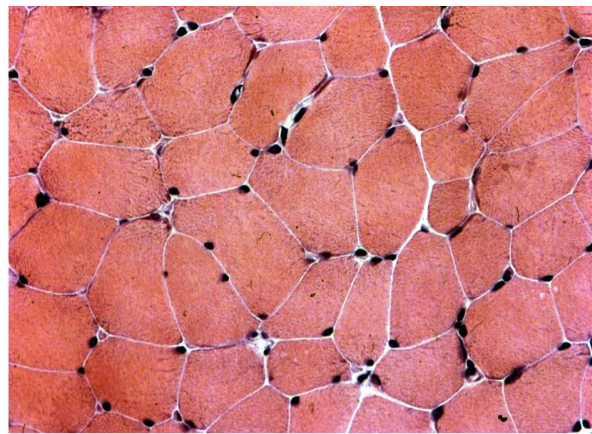
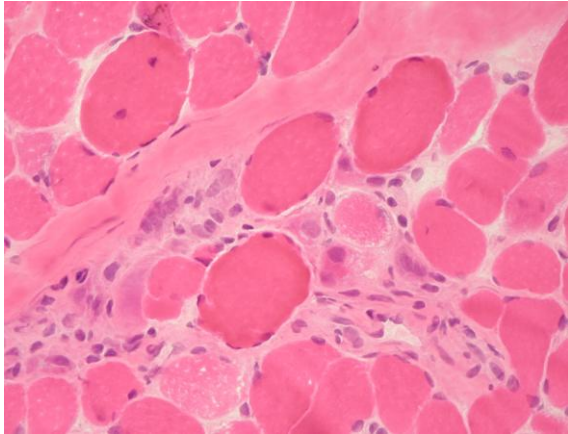


Abbildung 1.2 HE Färbung.

a DMD-Muskel mit vermehrtem Bindegewebe, Faserdegeneration und -regeneration, zentralen Kernen, Faser-Splitting, x 200.

b Normalkontrolle, x 200.

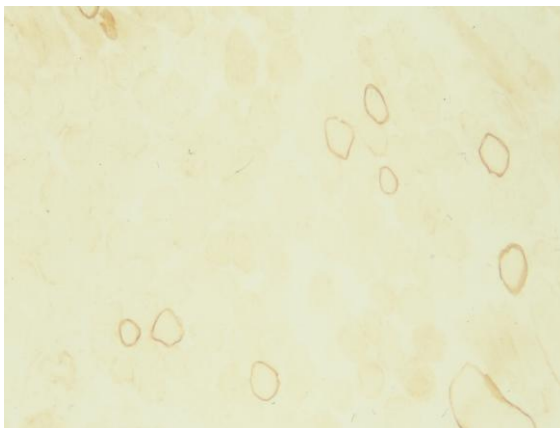


Abbildung 1.3 Immunhistochemie mit Dys2 Antikörper (C-Terminus).

a DMD-Muskel, fast vollständiges Fehlen von Dystrophin, einzelne revertante Fasern, x 200.

b Normalkontrolle mit kontinuierlicher Darstellung der Muskelzellwand, x 200.

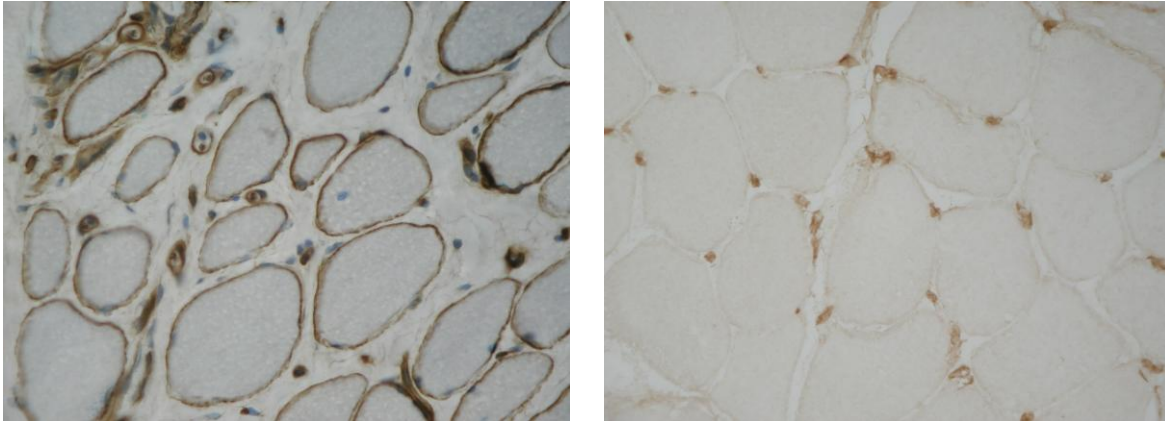


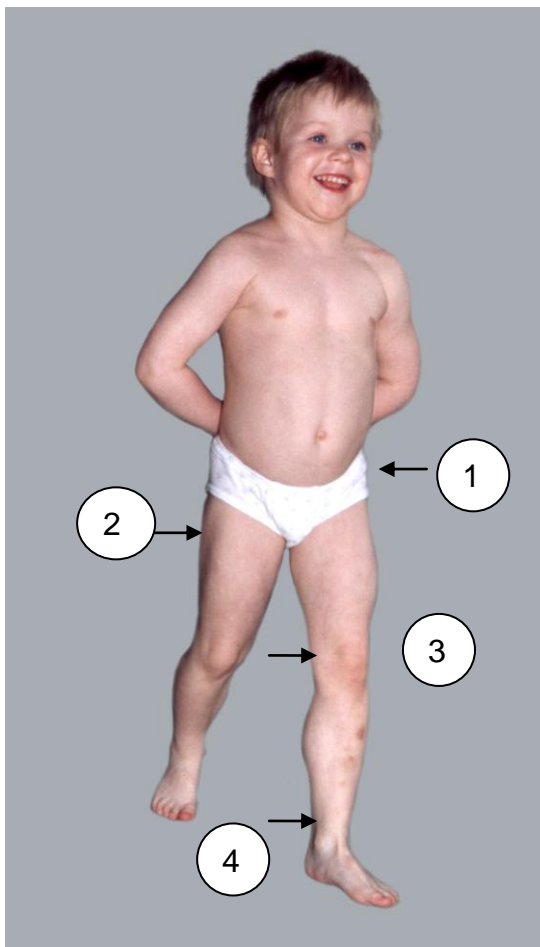
Abbildung 1.4 Immunhistochemie mit Utrophin Antikörper.

- a** DMD-Muskel mit gesteigerte Expression im Bereich der gesamten Muskelzellwand, x 400.
- b** Normalkontrolle mit spärlicher fokaler Expression (im Bereich von Endplatten), x 400.

### 1.2.3 Symptomatische Therapie

Kurative Behandlungsmöglichkeiten stehen für die DMD bisher nicht zur Verfügung. Die therapeutischen Möglichkeiten sind daher auf symptomatische Maßnahmen beschränkt. Im Frühstadium der Erkrankung kann eine konsequente Lagerungs- und Dehnungsbehandlung die Entwicklung von Kontrakturen verzögern. Manifeste Kontrakturen können durch eine kombinierte Weichteiloperation gelöst werden, um die Steh- und Gehfähigkeit länger zu erhalten und damit der Skolioseentwicklung entgegen zu wirken [275,108] (Abbildung 1.5). Der Erhalt des Gehens und Stehens kann auch durch Orthesen unterstützt werden [278,18]. Die progrediente Skoliose kann nur durch eine stabilisierende Wirbelsäulen-OP aufgehalten werden, um die Sitzfähigkeit zu erhalten [274,92].





1. Ablösung des M. rectus femoris
2. Teilresektion des M. tensor fasciae latae
3. Verlängerung der medialen Kniebeuger
4. Verlängerung der Achillessehne

**Abbildung 1.5** 5-jähriger Patient mit DMD, Eingriffe bei der kombinierten Weichteiloperation.

Von den zahlreichen Substanzen, die untersucht wurden wie z. B. Vitamin E, Selen, Nifedipin oder anabol wirksame Hormone, werden bisher nur die Steroide (Prednison, Deflazacort) in der Langzeittherapie eingesetzt. In vielen, häufig multizentrischen Therapiestudien konnte eine Verzögerung des Kraftverlustes gezeigt werden [222,216,128,271,35,221,30,207]. Die Dauertherapie mit Steroiden ist erwartungsgemäß mit erheblichen Nebenwirkungen behaftet. Bei den Patienten mit DMD stehen die Gewichtszunahme und Wachstumsstörungen im Vordergrund. Zur Reduktion der Nebenwirkungen sind sowohl die Steroidpulstherapie als auch die alternierende Steroidgabe mit Erfolg durchgeführt worden [67,87,30]. In einer aktuellen multizentrischen Studie wird die Wirksamkeit von Cyclosporin A (CsA) als

---

Monotherapie und in Kombination mit einem Steroid untersucht (Leitung Prof. Dr. Korinthenberg, Freiburg). In Pilotstudien wurde ein positiver Effekt von CsA auf die Kraftentfaltung gezeigt [291,225]. Die progrediente restriktive Ventilationsstörung kann sehr effektiv behandelt werden, da keine primäre Lungenerkrankung vorliegt [226,17,11,215,91]. Die Etablierung der häuslichen Masken-Beatmung hat zu einer mehrjährigen Verlängerung der Lebenserwartung geführt. Erreichte vor der Einführung der Heimbeatmung kein DMD-Patient (0 %) das 25. Lebensjahr, so werden über die Hälfte aller beatmeten Patienten (53 %) 25 Jahre und älter [91,92]. Im Verlauf des dritten Lebensjahrzehnts benötigen viele Patienten wegen der zunehmenden Schluckstörung eine perkutane Ernährungssonde.

#### **1.2.4 Experimentelle Therapie**

Verschiedene gentherapeutische Behandlungsstrategien sind Gegenstand der Forschung. Sie zielen entweder auf einen Ersatz des fehlenden Proteins oder auf eine Korrektur des mutierten Gens. Nach zunächst euphorischen Berichten über den Myoblastentransfer wurde deutlich, dass wesentliche Probleme noch nicht gelöst waren. Das Überleben der transferierten Myoblasten bei Patienten mit DMD war unzureichend, es wurde keine relevante Funktionsverbesserung erreicht [173,217,225,296,255]. Bislang ist es nicht gelungen, eine praktikable Technik zur Implantation von anhaltend vitalen, Dystrophin-positiven Myoblasten zu entwickeln [235].

Der Transfer des kompletten oder eines verkürzten DMD-Gens erfolgt intramuskulär oder parenteral mit viralen Vektoren. Es werden überwiegend Adenoviren oder Adenovirus-assoziierte-Viren eingesetzt [188,107,82,343], eine deutliche Verbesserung der Dystrophinexpression wurde durch einen parenteralen Gentransfer erreicht [151]. Auch die Applikation hochreiner DNA resultierte in einer Expression von Dystrophin bei der mdx Maus [200]. Durch einen intrauterinen Gentransfer gelang bei der mdx Maus eine anhaltende Expression des DMD-Gens in

---

den Skelettmuskeln, dem Herzmuskel und im Diaphragma [127]. Ziel ist die weitere Verbesserung des Gentransfers in den Muskel, um die Dystrophinexpression zu erhöhen und länger zu erhalten [89,167].

Bei der mdx Maus konnte durch Stammzelltransplantationen die Expression von Dystrophin und eine Verbesserung der Regeneration im Muskel erreicht werden [134,191]. Für nicht myogene Stammzellen und für Fibroblasten wurde gezeigt, dass sie unter dem Einfluss myogener Wachstumsfaktoren in myogene Zellen transformiert werden können [104,118,81]. Die intraarterielle Gabe mesangioplastischer Stammzellen verbesserte die Muskelfunktion beim Muskeldystrophie kranken Hund [283]. Durch die Untersuchung eines Jungen mit einer Dystrophinopathie, der wegen eines kombinierten Immundefektes als Kleinkind eine Knochenmarkstransplantation erhalten hatte, wurde allerdings deutlich, dass die Einwanderung hämatogener Stammzellen in den Muskel in vivo quantitativ längerfristig nicht von Bedeutung zu sein scheint [135].

Ein weiteres Behandlungskonzept besteht in der kompensatorischen Hochregulation anderer Proteine, die die Dystrophindefizienz kompensieren können [99]. Im Tiermodell führt die Stimulation der Expression von Utrophin zu einer Hemmung des dystrophischen Umbaus des Muskels [83,316,264]. Die Überexpression der Metalloproteinase ADAM12 bewirkt eine vermehrte Expression von Integrin $\alpha$ 7, Utrophin und anderen Glykoproteinen im Muskel der mdx-Maus und vermindert die Nekrose der Muskelzellen [231]. Auch die verstärkte Expression der glykolysierenden Enzyme 'zytotoxische T Zell GalNAc Transferase', der Glykosyltransferase LARGE, oder von IGF-1 führen zu einem milderem Phänotyp bei der mdx Maus [242,23,21].

Aminoglykoside können bewirken, dass Nonsense-Mutationen, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese führen würden, an den Ribosomen ignoriert werden und somit das Gen bis zum Ende abgelesen werden kann [251,155]. Bei

---

Dystrophin negativen mdx Mäusen wurde durch die Gabe von Gentamicin eine Expression von Dystrophin induziert [22], allerdings konnten diese Daten nicht von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden [90]. In Pilotstudien wurden die Dystrophinexpression nach einer Kurzzeittherapie mit Gentamicin und die Verträglichkeit bei Patienten mit Dystrophinopathien untersucht. Ototoxizität oder Nephrotoxizität wurden nicht nachgewiesen [329,261]. Politano et al. fanden eine deutlich gesteigerte Dystrophinexpression [261], Wagner et al. konnten keine vermehrte Dystrophinexpression nachweisen [329]. Es liegen keine kontrollierten Langzeit-Studien zur Wirksamkeit und zur Oto- und Nephrotoxizität vor.

Die Substanz PTC124 verfügt ebenfalls über die Eigenschaft, das Überlesen von Nonsense-Mutationen bedingten vorzeitigen Stopcodons an den Ribosomen zu induzieren [334]. Die Phase I Studien ergaben eine gute Verträglichkeit und Sicherheit der Substanz bei gesunden Erwachsenen [147]. Möglicherweise steht mit PTC124 eine Substanz zur Verfügung, mit der Erkrankungen, die durch Nonsense-Mutationen verursacht werden, behandelt werden können.

Durch "exon skipping" („Herausschneiden“ des mutationstragenden Exons im *DMD*-Gen durch Antisense-Oligonukleotide) konnte in Muskelzellen von DMD-Patienten die Expression eines verkürzten Dystrophins wieder hergestellt werden [84,204,214,1].

### 1.2.5 *DMD*-Gen

Das *DMD*-Gen liegt in der Region Xp21.1 [232,46]. Es ist mit 2,4 Megabasen eines der größten humanen Gene. Die 79 Exons des DMD entsprechen quantitativ nur ca. 2 % des gesamten Gens, die restlichen 98 % bestehen aus Introns [181,182,276]. Das vollständige Protein kann über den Muskel-Promotor (M-Dystrophin), den Purkinje-Zell-Promotor (P-Dystrophin) oder den Hirn-Promotor (C-Dystrophin) synthetisiert werden, die an verschiedenen Stellen im Exon 1 liegen. Interne

---

Promotoren ermöglichen die Synthese kleinerer Isoformen des Dystrophins, die in bestimmten Geweben bevorzugt exprimiert werden [75,201,44]. So werden die Isoformen Dp71 ubiquitär (durch alternatives Spleißen Dp40), Dp116 im peripheren Nerv, Dp140 im ZNS und in der Niere sowie Dp260 in der Retina und im ZNS exprimiert. Durch alternatives Spleißen im Bereich der Exons 71-74 (Herzmuskel) und des Exons 68 (glatte Muskulatur) können weitere Isoformen des Dystrophin generiert werden [103].

Die häufigsten Mutationen sind Deletionen (60-65%), seltener Duplikationen (6-10 %) [181,182,156] oder Punktmutationen [194]. Die Mutationen sind über alle Exons verteilt. Zwei so genannte "hot spots" gehäuft auftretender Mutationen liegen im Bereich der Exons 15-20 und 45-50 [182]. Der Phänotyp hängt sowohl davon ab, ob der Leserahmen verschoben wird (meist DMD) oder ob er erhalten bleibt (meist BMD), als auch von der Lokalisation der Mutation im Gen [194,195]. Mutationen in der Stab-förmigen Domäne, bei denen der N-Terminus und der C-Terminus erhalten bleiben, gehen mit einem milderem Phänotyp einher [182]. Abweichungen von der Leserahmenhypothese treten besonders bei Mutationen im Bereich der Exons 3-7 auf [206]. Liegt die Mutation im Bereich C-terminaler Exone, so ist mit einem schwereren Phänotyp zu rechnen [195].

### 1.2.6 Dystrophin und der Dystrophin-assoziierte Proteinkomplex

Dystrophin ist ein essentielles, costamersch strukturiertes Zytoskeletonprotein, das an der inneren Zellmembran liegt [12,36,330,307] und den kontraktilen Apparat über den Dystrophin-assoziierten-Proteinkomplex (DAP) mit der extrazellulären Matrix verbindet (Abbildung 1.6).

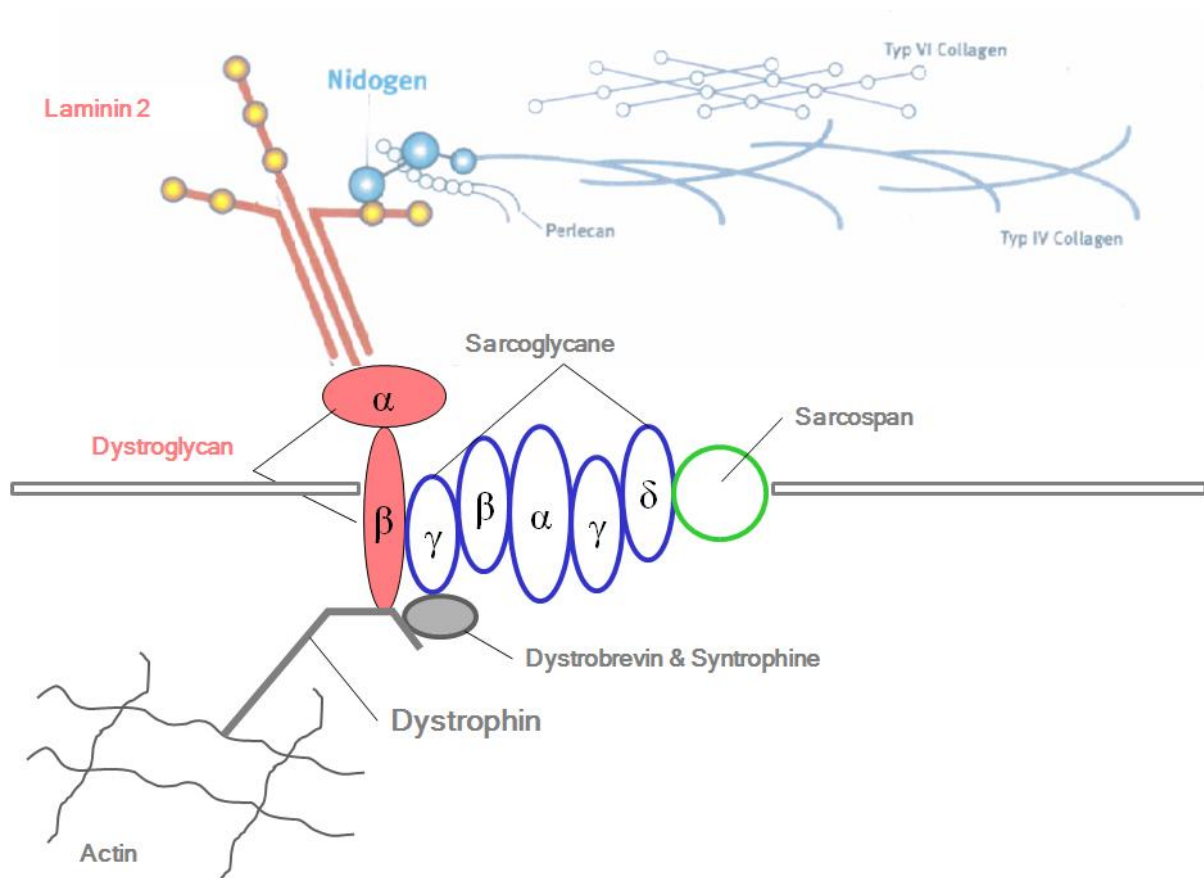


Abbildung 1.6

Schematische Darstellung der Vernetzung von Dystrophin, das den intrazellulär gelegenen kontraktilem Apparat über den Dystrophin-assoziierten Glykoproteinkomplex mit der Basalmembran und der extrazellulären Matrix verbindet.

Es besteht aus dem N-Terminus (Exons 1-8), der großen stabförmigen Domäne (Exons 10-63), der zystinreichen Region (Exons 64-67) und dem C-Terminus (Exons 68-79) [148,335]. Es weist eine hochgradige Homologie der Aminosäuresequenz und der Proteinstruktur zu Utrophin auf [315], das physiologisch im Bereich der neuromuskulären Endplatte lokalisiert ist. Der N-Terminus des DMD ist über drei Bindungsstellen mit  $\beta$ -Aktin und damit mit dem submembranösen Zytoskelet der Muskelzelle verbunden [197]. Die zentrale stabförmige Domäne des Dystrophins

macht ca. 75 % des Proteins aus [335]. Sie besteht aus einer Tripelhelix Spektrin-artiger Repeats, die durch Proteolyse-sensitive Bereiche (sog „hingee“) unterbrochen sind [183,341]. Es ist ein flexibler, mechanisch belastbarer Bereich [183] zwischen den Bindungsstellen für Aktin und dem C-Terminus, der mit der Membranoberfläche verknüpft ist.

Der C-Terminus weist eine komplexe Struktur mit verschiedenen Bindungsdomänen auf. Die Funktion der WW/WWP-Domäne ist unklar. Es wird eine Funktion bei der Protein-Protein Interaktion diskutiert, da sie in verschiedenen Spezies gut konserviert ist und auch in Wachstumsfaktoren nachweisbar ist [335]. Für die Kalziumbindung scheint die Tertiärstruktur der Domäne entscheidend zu sein [183,102,335]. Die Cystein-reiche Domäne bindet über  $\beta$ -Dystroglykan an die Glykoproteine des DAP [341,307]. Der Zink-bindenden ZZ-Domäne wird eine Funktion bei der Protein-Protein-Interaktion zugeschrieben [335]. Die spiralförmige Domäne mit Helix1 und Helix2 geht über  $\beta$ 1-Synthrophin eine Verbindung mit dem Synthrophin-Komplex und der neuronalen NO-Synthetase (nNOS) ein [315,32] (Abbildung 1.7).

Dystrophin und der DAP tragen entscheidend zur Stabilität und Elastizität der Muskelzellmembran bei, sie beeinflussen die biochemischen Eigenschaften des Muskels [159,258,265] und spielen eine Rolle bei der Signalübertragung zwischen der extrazellulären Matrix und dem intrazellulären Raum [44,139,269].

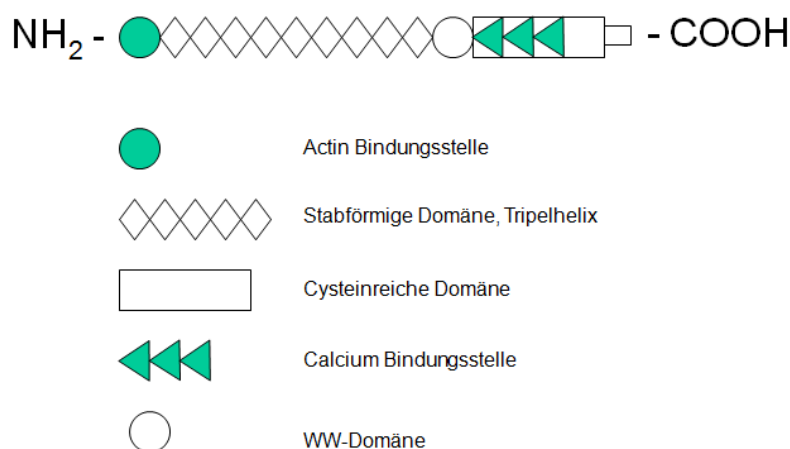


Abbildung 1.7 Schematische Darstellung des Aufbaus von Dystrophin.

### 1.2.7 Pathogenese

Mutationen im *DMD*-Gen führen zu einem nahezu vollständigen Verlust des Dystrophins oder zur Bildung eines verkürzten Proteins (Abbildung 1.3). Der Verlust von Dystrophin geht mit einer Defizienz von Proteinen des DAP [307] und einer kompensatorischen Hochregulation des Utrophins einher [315,316] (Abbildung 1.4).

Neben gesplitteten und degenerierenden Muskelfasern sind eine vermehrte Faserkalibervariation, zentrale Kerne und Regenerationsfasern sowie eine zelluläre Infiltration nachweisbar [97]. Die Zunahme des endo- und perimysiale Bindegewebes führt an der quergestreiften Muskulatur und am Herzmuskel zu einer progredienten fibrotischen Degeneration [12,150] (Abbildung 1.2).

Die genaue Pathogenese dieses Umbauprozesses der Muskulatur ist nicht geklärt. Unklar ist auch, warum bestimmte Muskelgruppen früher betroffen sind und warum die externen Augenmuskeln weitestgehend ausgespart bleiben (1.2.1). Als Ursache für das letztgenannte Phänomen werden eine bessere Kontrolle der intrazellulären Kalziumhomeostase und eine bessere Stabilität des Sarkolemms aufgrund einer gesteigerten Utrophinexpression diskutiert [8]. Es wurden vaskuläre, neurogene und myogene Faktoren als Ursache der Muskelfibrose diskutiert. Die diesen Hypothesen zugrunde liegenden Untersuchungsergebnisse konnten zum Teil nicht bestätigt werden oder es konnten damit nur Teilaspekte der pathophysiologischen Phänomene erklären werden [211]. Unstrittig ist, dass kleine Membranläsionen auftreten und dass als wesentliches Sekundärphänomen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Muskel erhöht ist [97]. Die intramuskuläre Vermehrung von  $\text{Ca}^{2+}$  ist durch einen gesteigerten aktiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bedingt [212,68]. Durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom können  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteasen und andere Proteine aktiviert werden, die Veränderungen der Muskelmembran, des Zytoskelets und der myofibrillären Strukturen verursachen und schließlich zur Fasernekrose führen [53,4]. Es treten entzündliche Veränderungen mit zellulären Infiltraten überwiegend aus CD4(+) und CD8(+) T-Lymphozyten und Makrophagen auf. Die zelluläre Immunantwort ist den Veränderungen bei der Polymyositis ähnlich. Es ist davon auszugehen, dass diese



immunologischen Reaktionen einen eigenständigen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung haben [300]. So führt die Depletion von CD4(+) oder CD8(+) T-Zellen bei der mdx Maus zu einem deutlichen Rückgang der histologischen Veränderungen im Muskel [301].

Im Bereich von Fasernekrosen im DMD-Muskel wurde eine signifikant gesteigerte Infiltration mit Mastzellen nachgewiesen [122]. Mastzellen treten in Zusammenhang mit Organfibrosen auf und werden durch TGF- $\beta$ 1 chemotaktisch angezogen [130]. Es dürfte sich dabei auch um ein Sekundärphänomen in Zusammenhang mit der Zunahme von TGF- $\beta$ 1 im DMD-Muskel handeln (1.3.4).

Die Reduktion der membranständigen neuronalen NO-Synthase (nNOS) [41] führt zu einem verminderten Schutz gegen die oxidative Schädigung von Proteinen [142]. Weitere Faktoren, die zur Fibrosierung der Muskulatur beitragen, sind unter 1.3.4 aufgeführt.

Es wurde eine Erschöpfung der Regenerationsfähigkeit ("replicative aging") der Muskulatur postuliert [331]. Die Zahl der Satellitenzellen pro Muskelfaser ist bei der DMD jedoch im Vergleich zu Befunden gesunder Muskelgewebe fünffach erhöht [97]. Die Bestimmung der Telomerlängen im DMD-Muskel ergab keinen Hinweis auf eine frühzeitige Verkürzung der Telomere, dieses würde auf eine replikative Alterung hinweisen [245]. In der alternden Zelle nimmt der Quotient von Cu/Zn-Superoxid Dismutase zu Gluthationperoxidase zu [136], im DMD-Muskel war der Quotient vermindert [47]. Diese Befunde und die Ergebnisse von Untersuchungen zum Wachstums- und Differenzierungsverhalten von DMD-Zellkulturen weisen eher auf eine Differenzierungsstörung als auf eine Erschöpfung der Regenerationsfähigkeit hin [246].

Die Untersuchung der Genexpression im DMD-Muskel mittels Microarray Analyse kann Daten zum besseren Verständnis der komplexen Pathogenese der Muskeldystrophie liefern. Die bisher vorliegenden Ergebnisse weisen auf eine

vermehrte Expression von Genen hin, die Komponenten der ECM, Bestandteile des Sarkomers, Wachstumsfaktoren und an der Immunantwort beteiligte Faktoren kodieren [60,140,244].

## 1.3 Extrazelluläre Matrix

### 1.3.1 Komponenten der extrazellulären Matrix

Die wesentlichen Bestandteile der ECM sind Kollagene, Glykoproteine und Proteoglykane, wobei diese „klassische“ Unterteilung nur bedingt zutrifft, da im Verlauf der Entwicklung durch den Austausch wichtiger Module so genannte Mosaikproteine entstanden sind, die verschiedene funktionelle Domänen enthalten. So sind zum Beispiel die ca. 200 AS lange A-Domäne des von-Willebrand-Faktors in den nicht-kollagenen Anteilen der Kollagene VI und XII und in den  $\alpha$ -Ketten verschiedener Integrine enthalten [65], und Sequenzen des Glykoproteins Fibronectin sind Bestandteil von Tenascin, den Kollagenen XII und XIV und von Adhäsionsmolekülen wie dem Contactin [286]. Weitere Proteinfamilien in der ECM sind z. B. die Matriline [79] und die Fibuline [93].

Kollagene sind Makromoleküle mit unterschiedlicher Struktur und Funktion, die mindestens eine Domäne mit einer Tripelhelixstruktur aufweisen. Bei den Kollagenen unterscheidet man fibrilläre Kollagene I-III, V und XI und fibrillenvernetzende Kollagene. Letztere werden in Untergruppen wie die membranbildenden Kollagene IV oder VIII, die FACITs (fibril-associated collagens with interrupted triple helices), das Ankerkollagen VII und das perlschnurartige Filament Kollagen VI unterteilt [324, 286]. Kollagene bestehen aus 1 bis 5 genetisch unterschiedlichen determinierten Ketten, von denen drei eine Tripelhelixstruktur bilden. Während die fibrillären Kollagene zu einem Großteil aus Tripelhelixdomänen bestehen, findet man letztere mit nur einem Anteil von 10-30 % bei den fibrillenvernetzenden Kollagenen VI, XII und XIV. Die nicht-kollagenen Domänen dienen der supramolekularen Vernetzung

und Interaktion [324], aber auch Abschnitte der Tripelhelix können Rezeptorfunktion z. B. für Wachstumsfaktoren haben [297].

Glykoproteine tragen wesentlich zur Komplexität und Plastizität der ECM bei. Sie enthalten zahlreiche Domänen, die mit anderen Matrixkomponenten, Zellen und Wachstumsfaktoren interagieren können [98,313]. Von Proteinen wie dem Laminin, Fibronectin oder Tenascin existieren mehrere Isoformen, die durch verschiedene Gene oder durch Spleißvarianten kodiert werden. Die Laminine bestehen aus jeweils drei genetisch unterschiedlich determinierten Ketten, die eine kreuzförmige Struktur bilden [321]. Laminine können sowohl über Integrine als auch über den DAP und Dystrophin die ECM mittels eines transmembranösen Proteinkomplexes mit dem Zytoskeletton verbinden [322], (Abbildung 1.6). Integrine sind transmembranöse Heterodimere, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit gebildet werden. Die 15- $\alpha$ - und 8- $\beta$ -Untereinheiten bilden in unterschiedlichen Kombinationen die verschiedenen Integrine, die spezifische Bindungseigenschaften zu Komponenten der ECM aufweisen [286,273]. Integrine sind entscheidend an der Signaltransduktion beteiligt. Durch Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne kommt es zu einer Konformationsänderung der zytoplasmatischen Domäne und zur Aktivierung intrazellulärer Stoffwechselprozesse ("outside-in-signaling"). Andererseits kann durch Bindung zytoplasmatischer Proteine das Bindungsverhalten der extrazellulären Domäne beeinflusst werden ("inside-out-signaling") [281].

Die Isoformen des Fibronectins entstehen durch alternatives Spleißen [185]. Dieses Mosaikprotein verfügt über zahlreiche Bindungsdomänen und ist an essentiellen Funktionen wie ECM-Organisation, Migration und Proliferation beteiligt.

Proteoglykane (PGs) bestehen aus einem Proteinkern mit verschiedenen Bindungsdomänen und mindestens einer Glykosaminoglykan-Seitenkette (Chondroitin-/ Dermatan-/ Keratan-/ Heparansulfat) [286]. Beispiele sind das große Heparan/Chondroitinsulfat PG Perlecan in der Basalmembran, die kleinen interstitiellen Chondroitin/Dermatansulfat PG Decorin und Biglycan oder die transmembranösen Heparan/Chondroitinsulfat PG, die Syndecane [138]. PGs

interagieren mit verschiedenen anderen Komponenten der ECM und des DAP [40,153]. Sie können sowohl Wachstumsfaktoren binden als auch in deren Aktivierung involviert sein [179,146,243]. Sie sind damit entscheidend an der Regulation von Wachstum und Differenzierung von Geweben beteiligt. Beispielsweise wird im Muskel in einem frühen Stadium sowohl der Embryonalentwicklung als auch der posttraumatischen Regeneration Decorin synthetisiert [56], das mit verschiedenen Proteinen der ECM und Wachstumsfaktoren interagiert [146,314] und an der Regulation basaler Funktionen wie der Zelladhäsion und Migration beteiligt ist [219,220]. Matrilin treten überwiegend in Assoziation mit den Proteoglykanen auf [93]. Wichtige Bestandteile der ECM sind sowohl die an verschiedene Proteine gebundenen Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren [169,76,292] als auch ECM abbauende Proteasen und deren Inhibitoren [336].

### **1.3.2 Stoffwechsel und Funktion der extrazellulären Matrix**

Die extrazelluläre Matrix ist eine dynamische supramolekulare Struktur, die in permanenter Wechselwirkung mit den Zellen steht und deren Wachstum reguliert und Überleben und Differenzierung ermöglicht [58,213,250]. Umfangreiche Untersuchungen liegen beispielsweise zur Regulation der Menstruation und der Reproduktion [158], zur Embryonalentwicklung [328], zum Knochenstoffwechsel [100] und zur Wundheilung [45] vor.

Die Synthese der ECM-Komponenten wird über Wachstumsfaktoren wie TGF oder FGF und über die Integrine und deren Rezeptoren an den Fibroblasten reguliert [93]. Der Abbau von ECM erfolgt über Metalloproteinasen und weitere Proteasen wie die Serin-Proteasen und die Cystein-Proteasen.

In der großen Gruppe der Metalloproteinasen gehören die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) zu den Metzincinen [34], die durch eine identische Struktur für die Zinkbindung charakterisiert sind. Es sind 23 MMPs beim Menschen bekannt, die in Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13), Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11) und Matrilysine (MMP-7, MMP-26) sowie

---

Membran assoziierte MMPs (MMP-14 bis MMP-17, MMP-23-MMP-25) und weitere MMPs (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-28) unterteilt werden [213]. Die MMPs sind Zink- und Kalzium-abhängige Proteasen, die sowohl eine Substratspezifität für eine oder mehrere Komponenten der ECM als auch für andere Substrate wie Bindungsproteine, Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren haben [302]. Zusammen können die MMPs alle Bestandteile der ECM abbauen [336,213]. Sie sind durch Sequenzhomologien mit der MMP-1 (Kollagenase-1) und die Inhibition durch spezifische Gewebeinhibitoren (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) gekennzeichnet.

Die Mehrzahl der MMPs werden als Proenzym (ProMMP) synthetisiert und anschließend aktiviert. Die Aktivierung kann über Proteinase wie Trypsin, Chymase und MMPs oder nicht-proteolytisch durch Metallionen, infolge eines niedrigen pH-Wertes oder AMPA (4-amino-phenylmercuric acetate) erfolgen [336]. ProMMP-2 kann an der Zelloberfläche auch durch einen Komplex aus TIMP-2/MT(Membran-Typ)1-MMP aktiviert werden [50].

Die MMP-Aktivität kann durch EDTA, Acetylcystein oder D-Penicillamin durch Chelatbildung mit dem Zink im aktiven Zentrum und dem Ersetzen des Zinkmoleküls in einem zweiten Schritt gehemmt werden. Auch Antibiotika (Erythromycin, Tetrazykline) hemmen durch Chelatbindung die Enzymaktivität [336]. Im humanen Serum werden die MMPs durch die Interaktion mit  $\alpha$ 2-Makroglobulin inhibiert [240]. Die wichtigsten natürlichen Inhibitoren der MMPs sind die TIMPs, die durch eine stoichiometrische Bindung der N-terminalen Region an die aktive Zink-bindende Domäne der MMPs deren Enzymaktivität hemmen [241,121]. Es wurden bisher 4 TIMPs identifiziert, die mit unterschiedlicher Affinität alle MMPs hemmen können. [336,320]. TIMP-1 und TIMP-2 sind löslich und wurden in den meisten Geweben und in den Körperflüssigkeiten nachgewiesen. TIMP-3 ist unlöslich und ist in der ECM

lokalisiert [190], TIMP-4 wird bevorzugt im Herzmuskel und in den Ovarien exprimiert [126,266].

Neben der Hemmung der Enzymaktivität der aktivierten MMPs können TIMPs auch die gonadale Steroidsynthese und die embryonale Knochenentwicklung beeinflussen. Sie inhibieren die Angiogeneese und können als Wachstumsfaktor wirken. Die TIMP-Expression kann durch TGF $\beta$ 1, IL-6, EGF (epithelic growth factor) oder durch luteinisierendes Hormon stimuliert werden [120].

Störungen des ECM-Stoffwechsels spielen eine wichtige Rolle für die Pathophysiologie einer Vielzahl von Erkrankungen [257]. Die gesteigerte Aktivität von MMPs fördert sowohl die Metastasierung als auch das lokal invasive Wachstum von Tumoren [64,58]. Beispielsweise kommt es beim Kolonkarzinom durch eine Mutation im *APC*- oder  *$\beta$ -Catenin*-Gen zu einer Aufhebung der Hemmung der MMP-7-Transkription [234] und die Expression von MMP-3 fördert die Tumorausbreitung in der Brustdrüse [306]. Die Aktivierung von MMPs führt bei rheumatischen Erkrankungen zur Gelenkdestruktion [267] und zu Gefäßwandveränderungen bei der Arteriosklerose [54]. Auch in die Pathogenese der Enzephalitis disseminata und des Morbus Alzheimer sind MMPs involviert [340]. Die Hochregulation von TIMP-1 trägt zur Entstehung von Organfibrosen wie zum Beispiel der Leberfibrose [144] der Lungenfibrose [312] oder der Kollagenösen Colitis [131] bei.

### 1.3.3 Erkrankungen der extrazellulären Matrix

Mutationen in Genen, die Komponenten der ECM kodieren, können zu Erkrankungen des Muskels, des Bindegewebes und des Knochens führen. Sind die fibrillären Kollagene betroffen, treten Erkrankungen wie die Osteogenesis imperfecta I (Kollagen I,  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Kette), die Spondyloepiphysäre Dysplasie (Kollagen II), das Ehlers-Danlos-Syndrom (Kollagen III) oder das Stickler-Syndrom (Kollagen XI) auf. Mutationen im Gen für das Fibrillen-assoziierte Kollagen IX gehen mit der multiplen epiphysären Dysplasie einher, Mutationen im Gen für das netzbildendes Kollagen X führen zu der metaphysären Dysplasie Typ Schmid [187].

Ist Kollagen VI betroffen, können sowohl die autosomal rezessiv vererbte kongenitale Muskeldystrophie (CMD) Typ Ullrich als auch die autosomal dominant vererbte Bethlem-Myopathie auftreten [168,326]. Auch Mutationen in den Genen, die Integrin  $\alpha 7$  (ITGA7) und die  $\alpha 2$ -Kette von Laminin2 (MDC1A) kodieren, führen zu einer CMD [141,317,337] (Tabelle 1.1).

**Tabelle 1.1**

**Muskelerkrankungen, die durch Mutationen in Genen verursacht werden, die Komponenten der ECM/Basalmembran kodieren. AD: autosomal dominant; AR: autosomal rezessiv; CMD: kongenitale Muskeldystrophie**

| Protein                   | Erkrankung                          | Erbgang |
|---------------------------|-------------------------------------|---------|
| Laminin2, $\alpha$ -Kette | CMD mit Merosinmangel               | AR      |
| Integrin $\alpha 7$       | CMD mit Integrin $\alpha 7$ -Mangel | AR      |
| Kollagen VI               | CMD Typ Ullrich                     | AR      |
| Kollagen VI               | Bethlem-Myopathie                   | AD      |

### 1.3.4 Extrazelluläre Matrix und Muskeldystrophie Typ Duchenne

Die progrediente Vermehrung der endo- und perimysialen ECM ist ein dominierendes histologisches Merkmal der DMD. Bereits 1959 stellten Bourne und Gollarz eine Erkrankung des Bindegewebes als mögliche Ursache der DMD zur Diskussion [39]. Die Beobachtung, dass die Fibrose nicht auf eine fokale reaktive Bindegewebsvermehrung im Bereich von Fasernekrosen begrenzt ist, sondern wie die Fibroblasten diffus endomyseal, einzelne Fasern ummauernd verteilt ist, wurde als Kriterium einer aktiven, pathogenetisch bedeutsamen Proliferation des Bindegewebes gedeutet [57,88]. Anhand von immunhistochemischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass an diesem Prozess die Kollagene (I, III, IV, V,

---

VI, XIV) [88,305,137,325], die Glykoproteine (Tenascin, Fibronectin) [133,137,268] und Proteoglykane [29,6] beteiligt sind.

Untersuchungen zur Kollagensynthese bei DMD blieben widersprüchlich. Einerseits wurde von einer vermehrten Kollagensynthese in Myoblasten-Kulturen berichtet [163], de Jonge et al. wiesen einen normalen Kollagenstoffwechsel in Myoblasten-Kulturen nach [170]. In Hautfibroblasten von DMD-Patienten wurden sowohl eine verminderte Kollagensynthese [277] als auch eine gesteigerte [164] und eine normale Kollagensynthese gefunden [304].

Im DMD-Muskel wurden eine gesteigerte mRNA-Expression und eine verstärkte Proteindarstellung des fibrogenen Wachstumsfaktors TGF(transforming growth factor) - $\beta$ 1 [339,26] nachgewiesen. Der Serumspiegel von TGF- $\beta$ 1 war bei DMD-Patienten ebenfalls erhöht [165]. Bei der Entstehung von Organfibrosen spielt TGF- $\beta$ 1 eine entscheidende Rolle [38]. Es stimuliert u. a. die Synthese von Bestandteilen der ECM [33], beeinflusst die Bildung von TIMPs und MMPs und ist ein potenter chemotaktischer Faktor für Mastzellen [130]. Die Proliferation und Degranulation von Mastzellen sind für die Pathogenese von Organfibrosen von Bedeutung [198,3]. Gorospe et al. konnten eine vermehrte besonders endomyseale Infiltration mit Mastzellen im DMD-Muskel nachweisen [122]. Immunhistochemisch war vermehrt TGF- $\beta$ 2 in nekrotisierenden, regenerierenden und in Fasern mit zentralem Kern nachweisbar [239]. Ein erhöhte Serumspiegel von bFGF(basic fibroblast growth factor) wurde bei 11 von 18 Patienten mit DMD [77] nachgewiesen.

Nicht-fibrogene Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren wie IGF (Insulin like Growth Factor)-II, IGF-I-Rezeptor [145] und LNGFR (Low-affinity nerve growth factor receptor) [20] wurden in regenerierenden Muskelfasern verstärkt exprimiert. Die Microarray Analyse der Genexpression im DMD-Muskel ergab eine Hochregulation dieser Wachstumsfaktoren.



### 1.4 Tiermodelle der Dystrophinopathie

Der Vergleich zwischen verschiedenen Spezies mit einer Dystrophinopathie mit hochgradiger Reduktion des Dystrophins (< 5 %) ergibt eine reziproke Relation zwischen der Gutartigkeit des Krankheitsverlaufes und dem Grad der Fibrose [149]. Führt die Dystrophindefizienz beim Mensch und beim Hund (cxmd: canine x-linked muscular dystrophy / GRMD: Golden Retriever muscular dystrophy) [69,323] zu einer schwer verlaufenden Muskeldystrophie mit frühzeitiger Muskelfibrose, so ist bei der Maus (mdx: x-linked muscular dystrophy) ein milder Phänotyp mit spät beginnender, mäßig ausgeprägter Muskelfibrose der Extremitätenmuskulatur zu beobachten [193,254]. Bei der Katze (hfmd: hypertrophic feline muscular dystrophy) tritt vor allem eine Muskelhypertrophie auf, die nicht durch die Muskelschwäche sondern durch eine die Atemwege verlegende Muskelhypertrophie lebensbedrohlich sein kann [55,111] (Tabelle 1.2).

**Tabelle 1.2**

**Beziehung zwischen Fibrosegrad und Lebenserwartung bei verschiedenen Spezies mit einer Dystrophinopathie; cxmd Hund: canine x-linked muscular dystrophy; mdx Maus: x-linked muscular dystrophy (mouse); hfmd Katze: hypertrophic feline muscular dystrophy**

| <u>Spezies</u> | <u>Dystrophin</u> | <u>Muskelfibrose</u>        | <u>Lebenserwartung</u>    |
|----------------|-------------------|-----------------------------|---------------------------|
| DMD            | <5%               | schwere juvenile Fibrose    | 30 %                      |
| cxmd Hund      | <5%               | schwere juvenile Fibrose    | 30 %                      |
| mdx Maus       | <5%               | geringe späte Fibrose       | 70 %                      |
| hfmd Katze     | <5%               | keine Fibrose, Hypertrophie | meist keine Einschränkung |

Bei dem cxmd Hund treten in den ersten Wochen bis zum 30. Lebensstag zunehmend Muskelfasernekrosen und -regenerate sowie hyperkontrahierte Muskelfasern auf. [73]. Dabei entsteht frühzeitig eine ausgeprägte Muskelfibrose. Der Prozentsatz nekrotisierender Fasern bleibt nach einem passageren Abfall stabil um 2 %, der

---

Prozentsatz regenerierender Fasern fällt von 10 % mit 30 Tagen auf < 0,5 % bei älteren Hunden.

Im Muskel ist die Anzahl der Mastzellen besonders endomyseal stark vermehrt. Sie werden bevorzugt im Bereich fokaler Nekrosen nachgewiesen [122].

Die Zahl der mRNA-Transkripte von TGF- $\beta$ 1 ist bis zum Tag 30 signifikant erhöht, auch die Expression von CTGF (connective tissue growth factor) ist bis zum Tag 30 hochreguliert [252]. Diese Zytokine scheinen für die frühe Entstehung der Muskelfibrose von entscheidender Bedeutung zu sein. Im Gegensatz zum humanen Phänotyp ist bei dem cxmd Hund die Fibrosierung nach der raschen Entwicklung zu Beginn der Erkrankung bei älteren Tieren nicht mehr progredient [73].

Bei der mdx-Maus tritt nach den ersten 3 Lebenswochen eine Phase mit ausgeprägter Nekrotisierung und Degeneration von Muskelfasern und einer lebhaften Regeneration auf [253]. Es resultiert im Alter von 2 Monaten ein myopathisches Gewebesyndrom mit vermehrter Faserkalibervariation und zentralständigen Kernen. Eine progrediente Muskelfibrose entwickelt sich zuerst nur im Diaphragma [303], die Extremitätenmuskulatur ist erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt betroffen [254]. Es wurde starke Vermehrung von Mastzellen besonders bei Gruppen nekrotisierender Muskelfasern nachgewiesen [122]. Die Expression von TGF- $\beta$ 1 ist sowohl im Skelettmuskel (M.quadriceps femoris) als auch im Diaphragma hochreguliert [160,346]. Beim älteren Tier ist eine gesteigerte Expression nur noch im Skelettmuskel nachweisbar aber nicht mehr im Diaphragma [346].

Auch bFGF ist vermehrt im Muskel nachweisbar [86].

Kherif et al. [175] konnten eine signifikant erhöhte mRNA-Expression und Enzymaktivität von MMP-2 und MMP-9 im mdx-Muskel nachweisen. Die MMP-2 Aktivität wurde der Regeneration zugeordnet, die MMP-9 Aktivität der entzündlichen Reaktion im Muskel.

Bei der hfmd Katze wurden sowohl eine hochsignifikante Vermehrung von Tryptasehaltigen Mastzellen im Endomysium im Bereich von Fasernekrosen und sehr

---

unreifen Regeneratfasern als auch eine signifikante Zunahme von bFGF in regenerierenden Muskelfasern nachgewiesen [288].

Die Dystrophindefizienz führt bei den verschiedenen Spezies zu unterschiedlichen Schädigungsmustern. Den Tieren ist gemein, dass in den ersten Lebenswochen eine Phase sehr aktiver Nekrotisierung und Regeneration auftritt, die bei der Maus in ein myopathisches Gewebesyndrom ohne Fibrose der Extremitätenmuskulatur, bei der Katze zu einer Muskelhypertrophie und beim Hund zu einer früh ausgeprägten Fibrose führt. Der Dystrophinmangel ist sicher Auslöser der pathophysiologischen Vorgänge, anscheinend entwickeln sich abhängig von den variablen Standortbedingungen unterschiedliche Phänotypen.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die fortschreitende Fibrose der quergestreiften Muskulatur ist das dominierende histologische Merkmal im Krankheitsverlauf der DMD, wobei der Zusammenhang zwischen dem Fehlen von Dystrophin und der Zunahme der endo- und perimysialen ECM nicht geklärt ist. Die Schwere der klinischen Symptomatik steht sowohl bei den Dystrophinopathien des Menschen als auch bei verschiedenen Spezies mit einer Dystrophinopathie in Zusammenhang mit dem Ausmaß der Muskelfibrose. Für die DMD lagen überwiegend histochemische und immunhistochemische Untersuchungen zur Darstellung der ECM-Komponenten und einzelne Publikationen zur Expression fibrogener Wachstumsfaktoren vor.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Stoffwechsel der ECM im DMD-Muskel genauer zu charakterisieren. Im Vordergrund stand dabei die Frage, ob neben der gesteigerten Synthese der ECM auch eine Hemmung des ECM-Abbaus von Bedeutung für die progrediente Muskelfibrose sein könnte.

Dafür wurden die Matrix Metalloproteinasen MMP-1 (Kollagenase) und MMP-2 (Gelatinase) sowie die wichtigsten Gewebeinhibitoren der Matrix Metalloproteinasen TIMP-1 und TIMP-2 im DMD-Muskel untersucht. Es sollten sowohl die Lokalisation

und Quantifizierung der mRNA-Expression als auch die Proteindarstellung mit Bestimmung der Enzymaktivität der MMPs erfolgen.

Mit der Bestimmung der Serumwerte der ECM-Komponenten Kollagen I, Kollagen III, Kollagen VI und Tenascin sowie von dem Basalmembran ständigen Laminin P1 und TIMP-1 sollte geprüft werden, ob einfach und im Verlauf wiederholt zu erhebende Parameter zur Verfügung stehen, die mit der Muskelfibrose zusammenhängen.

## 2 Patienten

Die Serumproben und Muskelbiopsien stammen von Patienten, die in der Charité neuropädiatrisch betreut wurden. Die Diagnose wurde anhand klinischer, biochemischer (erhöhte Aktivität der Kreatinkinase im Serum), immunhistochemischer (im Muskelbiopsat Dystrophin hochgradig reduziert oder fehlend, Utrophin hochreguliert) und molekulargenetischer Befunde (entsprechende Mutationen im *DMD*-Gen) gestellt. In den meisten Fällen wurde eine Multiplex-PCR zum Nachweis von Deletionen durchgeführt, nur in wenigen Ausnahmen eine weitergehende Analyse zur Identifizierung von Duplikationen oder Punktmutationen. Die Untersuchungen erfolgten fortlaufend anhand von Muskelbiopsien und Serumproben von Patienten, die sich zur Diagnostik oder zur operativen Therapie in stationärer Behandlung befanden. Es erfolgten keine Blutentnahmen oder Muskelbiopsien allein zu wissenschaftlichen Zwecken. Die zur Verfügung stehenden Untersuchungsmaterialien waren somit begrenzt.

Allen Untersuchungen, die über die zur Diagnosefindung notwendige Diagnostik hinausgingen, hat die Ethikkommission der Charité Campus Virchow zugestimmt.

### 2.1 Immunhistochemische Untersuchungen

Der qualitative Nachweis wichtiger Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) sowie von MMPs und TIMPs erfolgte mittels Immunhistochemie an Muskelproben von 21 Patienten (Tabelle 2.1). Bei 12 Patienten wurden die Kollagene I, III, IV, VI und XIV (Undulin) und bei 10 Patienten darüberhinaus Laminin  $\alpha 2$ , Tenascin und Fibronectin immunhistochemisch untersucht. Die Expression von MMPs und TIMPs wurde bei 11 Patienten dargestellt.

Tabelle 2.1

Angaben zu Patienten mit DMD, bei denen Proteine der extrazellulären Matrix, MMP-1 und MMP-2 sowie TIMP-1 und TIMP-2 im Muskelgewebe dargestellt wurden.

CIDD OE/UE: Internationale Klassifikation der motorischen Funktionsbeeinträchtigung der Arme/Beine;

Δ: Deletion; Deletion –: keine Deletion nachgewiesen;

#: Punktmutation;

\*<sup>1</sup>: Kollagen I, Prokollagen III, Kollagen IV, Kollagen VI;

\*<sup>2</sup>: Tenascin, Laminin α2, Fibronectin;

\*<sup>3</sup>: MMP-1, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2.

| Patient | Biopsie<br>[Lebens-<br>jahre] | CIDD<br>OE/U<br>E | Mutations<br>-<br>analyse | Kollagene* <sup>1</sup> | Andere<br>Proteine* <sup>2</sup> | MMP/<br>TIMP* <sup>3</sup> |
|---------|-------------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| KD      | 9                             | 2/4               | Δ45                       | +                       | +                                | +                          |
| TE      | 7                             | 2/4               | Deletion -                | +                       | +                                | +                          |
| GO      | 9                             | 3/5               | Deletion -                | +                       | +                                | +                          |
| GJ      | 8                             | 2/4               | Δ43                       | +                       | +                                |                            |
| AM      | 10                            | 3/7               | Deletion -                | +                       | +                                |                            |
| OB      | 10                            | 3/7               | Δ51                       | +                       | +                                |                            |
| MD      | 5                             | 1/2               | Δ46-51                    | +                       | +                                |                            |
| SSV     | 3                             | 1/1               | Δ10-43                    | +                       | +                                |                            |
| KM      | 7                             | 2/2               | Δ7-39                     | +                       | +                                |                            |
| BR      | 2,5                           | 1/1               | Δ48-49                    | +                       | +                                |                            |
| ET      | 3,5                           | 1/2               | Deletion -                | +                       |                                  | +                          |
| SS      | 6                             | 1/2               | Δ49-52                    |                         |                                  | +                          |
| GD      | 8                             | 2/                | Deletion -                |                         |                                  | +                          |
| VE      | 4                             | 1/2               | Deletion -                | +                       |                                  |                            |
| PK      | 8                             | 2/4               | Deletion-                 |                         |                                  | +                          |
| WS      | 8                             | 2/3               | Δ51                       |                         |                                  | +                          |
| PB      | 7                             | 2/4               | Δ46-49                    |                         |                                  | +                          |

Fortsetzung nächste Seite

| Patient | Biopsie<br>[Lebens-<br>jahre] | CIDD<br>OE/U<br>E | Mutations<br>-<br>analyse | Kollagene* <sup>1</sup> | Andere<br>Proteine* <sup>2</sup> | MMP/<br>TIMP* <sup>3</sup> |
|---------|-------------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| MM      | 7                             | 3/5               | Δ46-47                    |                         |                                  | +                          |
| NM      | 10                            | 3/5               | Deletion -                |                         |                                  | +                          |
| LM      | 4                             | 1/1               | Deletion -                |                         |                                  |                            |
| LMx     | 4,5                           | 1/2               | Δ49-50                    |                         |                                  |                            |

Als pathologische Kontrollen standen 9 Muskelproben (1 Gliedergürtelmuskeldystrophie (LGMD) 2A, 1 LGMD 2I, 2 Gliedergürtelmuskeldystrophien unklarer Ätiologie, 5 Myositiden) zur Verfügung.

Als Normalkontrollen konnten Muskelproben von 11 Patienten untersucht werden, bei denen wegen des Verdachts auf eine Muskelerkrankung eine Muskelbiopsie durchgeführt worden war, die jeweils als unauffällig befundet wurde.

## 2.2 Westernblot und Zymographie

Die Westernblotanalyse von MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 wurde an Muskelproben von 10 Patienten mit DMD durchgeführt. Die Enzymaktivität von MMP-2 und MMP-9 konnte mittels der Zymographie an 4 Muskelproben gemessen werden (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2

Angaben zu Patienten mit DMD, bei denen eine Westernblotanalyse von MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 und die Messung der Enzymaktivität von MMP-2 und MMP-9 im Muskelgewebe durchgeführt wurde.

CIDD OE/UE: Internationale Klassifikation der motorischen Funktionsbeeinträchtigung der Arme/Beine;

Δ: Deletion; Deletion -: keine Deletion nachgewiesen

#: Punktmutation

WB: Westernblot.

| Patient | Biopsie<br>[Lebensjahre] | CIDD<br>OE/UE | Mutations-<br>analyse | Zymographie | WB |
|---------|--------------------------|---------------|-----------------------|-------------|----|
| AM      | 10                       | 3/7           | Deletion -            |             | +  |
| ET      | 3,5                      | 1/2           | Deletion -            |             | +  |
| GD      | 8                        | 2/            | Deletion -            |             | +  |
| MD      | 5                        | 1/2           | Δ46-51                |             | +  |
| FS      | 4                        | 1/1           | Ex 4 <sup>#</sup>     |             | +  |
| VE      | 4                        | 1/2           | Deletion -            |             | +  |
| SSV     | 3                        | 1/1           | Δ10-43                |             | +  |
| NM      | 10                       | 3/5           | Deletion -            |             | +  |
| KM      | 7                        | 2/2           | Δ7-39                 |             | +  |
| LMx     | 4,5                      | 1/2           | Δ49-50                | +           | +  |
| LM      | 4                        | 1/1           | Deletion -            | +           |    |
| EO      | 6                        | 1/2           | Deletion -            | +           |    |
| GJ      | 8                        | 2/4           | Δ45                   | +           |    |

Als normale Kontrollen standen Muskelproben von 7 Patienten zur Verfügung, bei denen wegen des Verdachts auf eine Muskelerkrankung eine Muskelbiopsie durchgeführt worden war, die jeweils als unauffällig befundet worden waren.



### 2.3 *In situ*-Hybridisierung und quantitative mRNA-Bestimmung

Zur Untersuchung der mRNA-Transkripte von PCI (Kollagen I), PCIV (Kollagen IV), MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 wurden Muskelproben von 33 Patienten untersucht. Eine mRNA *in situ*-Hybridisierung (ISH) wurde an Gefrierschnitten von 29 Patienten durchgeführt (12 MMP-1/TIMP-1, 14 MMP-2/TIMP-2, 10 PCI/PCIV). Für die quantitative mRNA-Bestimmung standen Muskelbiopsien von 8 Patienten mit DMD zur Verfügung (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3

Angaben zu Patienten mit DMD, bei denen die Zahl der spezifischen mRNA-Transkripte von PCI (Kollagen I), PCIV (Kollagen IV), MMP-1, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 und die Enzymaktivität von MMP-2 im Muskelgewebe bestimmt wurden.

CIDD OE/UE: Internationale Klassifikation der motorischen Funktionsbeeinträchtigung der Arme/Beine;

\*1: Patient mit schwerster mentaler Retardierung, bei dem keine differenzierte Untersuchung motorischer Fähigkeiten möglich war;

Δ: Deletion; Deletion-: keine Deletion nachgewiesen;

dupl: Duplikation; ISH: *in situ*-Hybridisierung;

I: MMP-1 und TIMP-1; II: MMP-2 und TIMP-2; III: PCI und PCIV.

| Patient | Biopsie<br>[Lebensjahre] | CIDD<br>OE/UE | Mutationsanalyse | mRNA<br>ISH | mRNA<br>quantitativ |
|---------|--------------------------|---------------|------------------|-------------|---------------------|
| ET      | 3,5                      | 1/2           | Deletion -       | I, II, III  |                     |
| BR      | 2,5                      | 1/1           | Δ48-49           | I, II, III  |                     |
| EL      | 4,5                      | 2/2           | dupl 46-47       | I, II       |                     |
| GAD     | 4                        | 1/1           | Deletion -       | I, III      |                     |
| UK      | 4                        | 1/2           | Deletion -       | I, III      |                     |
| SM      | 4,5                      | 1/2           | Deletion -       | I           |                     |
| MM      | 7                        | 3/5           | Δ46-47           | I           |                     |
| GT      | 3                        | 1/1           | Deletion -       | I           |                     |
| KD      | 9                        | 2/4           | Δ51              | I           |                     |

Fortsetzung nächste Seite

| Patient | Biopsie<br>[Lebensjahre] | CIDD<br>OE/UE      | Mutationsanalyse | mRNA<br>ISH | mRNA<br>quantitativ |
|---------|--------------------------|--------------------|------------------|-------------|---------------------|
| KK      | 4                        | 1/2                | Δ45-47           | I           |                     |
| WS      | 7                        | 1/3                | Δ46-50           | I           |                     |
| ZL      | 2,5                      | 1/1                | Deletion -       | I           |                     |
| BE      | 3,5                      | 1/1                | Δ45-50           | II          |                     |
| NM      | 10                       | 3/6                | Deletion -       | II          |                     |
| ES      | 4                        | 1/2                | Δ44-47           | II          |                     |
| MA      | 4                        | 1/2                | Δ49-52           | II          |                     |
| LM      | 3,5                      | 1/2                | Δ49-50           | II          |                     |
| GM      | 4,5                      | 1/2                | Δ48-53           | II          |                     |
| BA      | 4                        | 1/1                | Δ46-51           | II          |                     |
| YM      | 3,5                      | 1/1                | Deletion -       | II          |                     |
| SC      | 9                        | 3/5                | duplEx10-19      | III         |                     |
| PB      | 7                        | 2/4                | Δ46-49           | III         |                     |
| TE      | 6                        | 2/3                | Δ51              | III         |                     |
| BV      | 6                        | 2/4                | n.u.             | III         |                     |
| OH      | 10                       | 3/7                | Δ45              | III         |                     |
| SS      | 6                        | 1/2                | Δ49-52           | II          | +                   |
| KM      | 7                        | 2/2                | Δ7-39            | II          | +                   |
| GD      | 8                        | 2/3                | Deletion -       | II          | +                   |
| AM      | 10                       | 3/7                | Deletion -       | III         | +                   |
| DA      | 13                       | 4/10* <sup>1</sup> | dupEx17-18       |             | +                   |
| LM      | 4                        | 1/2                | Deletion -       |             | +                   |
| GJ      | 8                        | 2/4                | Δ45              |             | +                   |
| LMx     | 4,5                      | 1/2                | Δ49-50           |             | +                   |

Als pathologische Kontrollen für die mRNA-Bestimmung wurden Muskelproben von 4 Patienten mit einer kongenitalen Muskeldystrophie (2 Laminin- $\alpha$ 2-negativ, 2 Laminin- $\alpha$ 2-positiv), von 7 Patienten mit einer LGMD (3 LGMD 2A, 1 LGMD 2C, 1 LGMD 2I, 2 LGMD unklarer Ätiologie), von 3 Patienten mit einer Mitochondriopathie (MERRF-Syndrom, Komplex IV-Defizienz, kombinierte Komplex I + IV-Defizienz), von 2 Patienten mit einer myotubulären Myopathie und von einem Patienten mit einer juvenilen Glykogenose Typ 2 untersucht. Bei der Bestimmung der mRNA-Transkripte von PCI und PCIV wurden auch 10 Muskelproben von Patienten mit einer spinalen Muskelatrophie vom Typ II untersucht.

Als normale Kontrollen standen Muskelproben von 15 Patienten zur Verfügung, bei denen wegen des Verdachts auf eine Muskelerkrankung eine Muskelbiopsie durchgeführt worden war, die jeweils als unauffällig befundet worden waren.

## 2.4 Serologische Untersuchungen

Die Serumspiegel von Prokollagen I, Prokollagen III und von Laminin P wurden bei 18 Patienten, Kollagen VI bei 28 Patienten, Tenascin bei 26 Patienten und TIMP-1 bei 29 Patienten mit DMD bestimmt. (Tabellen 2.4 und 2.5).

Tabelle 2.4

Angaben zu Patienten mit DMD, bei denen serologische Untersuchungen durchgeführt wurden. CIDD OE/UE: Internationale Klassifikation der motorischen Funktionsbeeinträchtigung bei DMD der Arme/Beine;

Δ: Deletion; Deletion-: keine Deletion nachgewiesen;

\*<sup>2</sup>: Punktmutation; n.u.: nicht untersucht;

PC I: Prokollagen I; PC III: Prokollagen III; PC VI: Kollagen VI; Lam: Laminin P; Te.: Tenascin

| Patient | Alter<br>[Jahre] | CIDD<br>OE/UE | Mutations-<br>analyse | PC I | PC<br>III | PC<br>VI | Lam | TIMP-1 | Ten |
|---------|------------------|---------------|-----------------------|------|-----------|----------|-----|--------|-----|
| BR      | 4                | 1/2           | Δ48-49                | +    | +         | +        | +   | +      | +   |
| WS      | 8                | 2/3           | Δ51                   | +    | +         | +        | +   | +      | +   |
| FS      | 4                | 1/1           | Ex 4 * <sup>1</sup>   | +    | +         | +        | +   |        | +   |
| LM      | 6                | 2/2           | Δ49-50                | +    | +         |          | +   | +      | +   |
| SSV     | 3                | 1/1           | Δ10-43                | +    | +         |          | +   | +      | +   |
| SSA     | 19               | 5/9           | n.u.                  | +    | +         | +        | +   |        |     |
| BA      | 9                | 3/4           | Δ46-51                | +    | +         |          | +   |        |     |
| KD      | 11               | 3/7           | Δ45                   | +    | +         |          | +   |        |     |
| KF      | 7                | 2/3           | Deletion -            | +    | +         |          | +   |        |     |
| MP      | 8                | 3/5           | Δ46-48                | +    | +         |          | +   |        |     |
| MA      | 7                | 2/3           | Δ49-52                | +    | +         |          | +   |        |     |
| PB      | 7                | 2/4           | Δ46-49                | +    | +         |          | +   |        |     |
| SD      | 11               | 3/8           | Deletion -            | +    | +         |          | +   |        |     |

Fortsetzung nächste Seite

| Patient | Alter<br>[Jahre] | CIDD<br>OE/UE | Mutations-<br>analyse | PC I | PC<br>III | PC<br>VI | Lam | TIMP-1 | Ten |
|---------|------------------|---------------|-----------------------|------|-----------|----------|-----|--------|-----|
| WM      | 12               | 3/8           | Deletion -            | +    | +         |          | +   |        |     |
| YE      | 4                | 1/2           | Deletion -            | +    | +         |          | +   |        |     |
| PS      | 16               | 4/9           | n.u.                  | +    | +         |          | +   |        |     |
| EM      | 18               | 5/9           | n.u.                  | +    | +         |          | +   |        |     |
| WMA     | 23               | 5/9           | n.u.                  | +    | +         |          | +   |        |     |
| BF      | 6                | 1/2           | $\Delta$ 48-49        |      |           |          | +   | +      | +   |
| KM      | 8                | 2/3           | $\Delta$ 7-39         |      |           |          | +   | +      | +   |
| WM      | 15               | 4/9           | Deletion -            |      |           |          | +   | +      | +   |
| MM      | 8                | 3/5           | $\Delta$ 46-47        |      |           |          | +   | +      | +   |
| SP      | 8                | 2/3           | n.u.                  |      |           |          | +   | +      |     |
| TT      | 4                | 1/2           | $\Delta$ 50           |      |           |          | +   | +      |     |
| GAN     | 5                | 1/2           | Deletion -            |      |           |          | +   | +      |     |
| KK      | 7                | 2/3           | $\Delta$ 45-47        |      |           |          | +   | +      |     |
| OW      | 4                | 1/1           | $\Delta$ 7-21         |      |           |          |     | +      | +   |
| FM      | 8                | 2/3           | $\Delta$ 51           |      |           |          |     | +      | +   |
| TR      | 7                | 2/3           | Deletion -            |      |           |          | +   |        |     |

Im Rahmen einer Kooperation mit der Universitätskinderklinik Bochum wurden 15 Serumproben von Patienten mit DMD, die eine Steroiddauertherapie erhielten, untersucht (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5

Angaben zu Patienten mit DMD, die eine Steroiddauertherapie von mindestens sechs Monaten erhielten.;

Δ: Deletion; Deletion -: keine Deletion nachgewiesen;

TIMP-1: tissue inhibitor of metalloproteinases-1.

| Patient | Alter<br>[Jahre]  | Mutations-<br>analyse | Steroid-<br>therapie<br>[Monate] | TIMP-1 | Kollagen<br>VI |
|---------|-------------------|-----------------------|----------------------------------|--------|----------------|
| BJ      | 15                | Deletion -            | 24                               | +      | +              |
| DB      | 12                | Δ8-27                 | 34                               | +      | +              |
| ES      | 11                | Δ44-47                | 57                               | +      | +              |
| GM      | 10 <sup>1/2</sup> | Δ48-53                | 25                               | +      | +              |
| GR      | 7                 | Δ48-53                | 25                               | +      | +              |
| HW      | 12 <sup>1/2</sup> | Δ46-48                | 64                               | +      | +              |
| H       | 15 <sup>1/2</sup> | Δ8-11                 | 57                               | +      | +              |
| KP      | 6 <sup>1/2</sup>  | Δ45-50                | 8                                | +      | +              |
| KJ      | 10                | Δ48-52                | 60                               | +      | +              |
| MF      | 9                 | Δ45                   | 29                               | +      | +              |
| MH      | 12                | Deletion -            | 61                               | +      | +              |
| SJU     | 7                 | Δ3-33                 | 14                               | +      | +              |
| ST      | 15                | Δ2-18                 | 61                               | +      | +              |
| SSE     | 7                 | Δ48-50                | 6                                | +      | +              |
| SJ      | 8                 | Δ50                   | 27                               | +      | +              |

Die Patienten erhielten eine Steroiddauertherapie (0,75 mg Prednison/kg KG/Tag oder 0,9 mg Deflazacort/kg KG/Tag) über mindestens 6 und maximal 61 Monate. Die Altersverteilung der Patientengruppe ohne eine Behandlung entsprach der mit einer Steroidtherapie.

Als pathologische Kontrollen wurden Serumproben von 5 Patienten mit einer Muskeldystrophie vom Typ Becker (BMD) und von jeweils 2 Patienten mit einer Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2A (LGMD2A), einer kongenitalen Muskeldystrophie mit Laminin- $\alpha$ 2-Defizienz (MDC1A) und einer Muskeldystrophie unklarer Ätiologie untersucht.

Für die untersuchten Parameter lagen die Normwerte für das Kindes- und Jugendalter vor.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

Es wurden Aliquots von Muskelgewebe- und Serumproben verwandt, die den Patienten zur Diagnostik bei Manifestation der Erkrankung und/oder im Verlauf zum Beispiel im Rahmen eines orthopädischen Eingriffs entnommen wurden.

##### 3.1.1 Muskelgewebe

Die Mehrzahl der verwandten Gewebeproben waren Nadelbiopsate aus dem M. quadriceps femoris vastus lateralis, wenige im Rahmen orthopädischer Weichteiloperationen gewonnene Muskelproben waren Biopsate aus dem M. tensor fasciae latae oder dem M. rectus femoris.

Das Muskelgewebe wurde sofort nach Entnahme weiterverarbeitet, um den Abbau von RNA durch ubiquitär vorhandene RNAsen zu verhindern. Der eine Teil des Gewebes wurde in Fixiermedium (Tissue tek<sup>®</sup>) auf einem Korkplättchen eingebettet und in flüssigem, in N<sub>2</sub> vorgekühltem Methylbutan und anschließend in flüssigem N<sub>2</sub> kryofixiert. Der andere Teil wurde nativ in einem sterilen Reaktionsgefäß in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Muskelproben bei -80°C gelagert.

##### 3.1.2 Serum

Das Serum wurde durch Zentrifugieren (1500 x g, 10 min, Raumtemperatur) aus Vollblut gewonnen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.



## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Immunhistochemie

Immunhistochemische Untersuchungen dienten der Darstellung bestimmter Komponenten der ECM, regenerierender Muskelfasern, der MMPs und TIMPs sowie der Doppelmarkierung in Kombination mit *in situ*-Hybridisierungen. Überwiegend erfolgte die Darstellung der Proteine mit der APAAP (Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase)-Methode, bei einigen Proteinen auch mit einem AK gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff. Zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen erfolgte jeweils eine Untersuchung ohne spezifischen Antikörper.

Bei der Doppelmarkierung konnte die *in situ*-Hybridisierung nur mit der APAAP-Methode kombiniert werden, da die mRNA-Signale mittels einer Fotoemulsion sichtbar gemacht wurden. Dabei musste auch die Immunhistochemie unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt werden (siehe unter "*in situ*-Hybridisierung").

#### APAAP-Methode

Die an der Luft getrockneten und in Aceton fixierten Gefrierschnitte (6  $\mu\text{m}$ ) wurden mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 3.1) über Nacht bei 4°C und anschließend für jeweils 30 min mit Kaninchen-anti-Maus Immunglobulin Antikörper (Dako Z 259, Verdünnung 1:20) und mit dem APAAP-Komplex (Dako D 0651, Verdünnung 1:50) inkubiert. Der Komplex wurde durch Inkubation mit der Entwicklungslösung (Lösung A: 62,5 ml Propandiol 0,2 M, 175 ml Trispuffer (pH 8,7), 0,1 g Levamisole, Lösung B: 0,12 g Naphthol, 1,7 ml Dimethylformamid, Lösung C: 0,05 g Na-Nitrit, 1,25 ml A.dest, 500  $\mu\text{l}$  Neufuchsin) sichtbar gemacht. Zwischen den Inkubationsschritten wurde gespült (Spülpuffer: 100 ml Tris-HCl Puffer 0,5 M; 100 ml NaCl 1,5 M; 800 ml A.dest). Zuletzt wurde die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt und in Aqua tex<sup>®</sup> eingebettet.

## Fluoreszenzimmunhistochemie

Die Gefrierschnitte (6  $\mu\text{m}$ ) wurden nach Spülung in Methanol bei Raumluft und PBS-Puffer auf Eis über 45 min mit 10% FCS/PBS/0,1% Triton x-100 (Sigma), lichtgeschützt vorinkubiert und anschließend über Nacht mit dem primären Antikörper (z. B. Kollagen VI) bei 4°C inkubiert. Der Komplex wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy<sup>TM</sup>3 (Jackson Immuno Research Laboratories; Verdünnung 1:300, Inkubation 60 min) sichtbar gemacht. Zwischen den Inkubationsschritten wurde der Schnitt lichtgeschützt und auf Eis mit PBS-Puffer gespült und anschließend in Aqua tex<sup>®</sup> eingebettet.

Tabelle 3.1

**Antikörper zur immunhistochemischen Darstellung von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), regenerierender Muskelzellen, von MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2. NCAM: Neuronales Zelladhäsionsmolekül (Regenerationsmarker für Muskelzellen)**

| Antikörper                         | Verdünnung | Hersteller           |
|------------------------------------|------------|----------------------|
| Anti-Kollagen I, $\alpha$ 1-Kette  | 1:2000     | Schuppan et al. 1985 |
| Anti-Prokollagen III               | 1:2000     | Schuppan et al. 1990 |
| Anti-Kollagen IV                   | 1:500      | Dianova              |
| Anti-Kollagen VI, $\alpha$ 1-Kette | 1:2500     | Chemicon             |
| Anti-Kollagen XIV (Undulin)        | 1:2000     | Schuppan et al. 1990 |
| Anti-Elastin                       | 1:100      | BioTrend             |
| Anti-Tenaszin                      | 1:2000     | Telios               |
| Anti-Fibronektin                   | 1:2000     | Chemicon             |
| Anti-MMP-1                         | 1:100      | Novus Molecular,     |
| Anti-MMP-2                         | 1:100      | Novus Molecular,     |
| Anti-TIMP-1                        | 1:100      | Novus Molecular,     |
| Anti-TIMP-2                        | 1:100      | Calbiochem           |
| Anti-N- CAM                        | 1:200      | Chemicon             |
| Anti-Desmin                        | 1:50       | DAKO                 |

### 3.2.2 Westernblot

Mit dem Westernblot wurden die matrixabbauenden Enzyme MMP-1 und MMP-2 sowie die Gewebeinhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 dargestellt. Dafür wurde natives Muskelgewebe zerkleinert und mit 1 %-igem SDS auf Eis mit dem Wheaton-Gewebe-Handhomogenisator homogenisiert. Zur Inaktivierung von Proteasen wurde das Gemisch für 5 min. auf 95°C erhitzt und zentrifugiert (12.000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde zur weiteren Verarbeitung aliquotiert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA Assay (Pierce, Illinois, USA). Dabei wird mit der Biuret-Methode die Absorption der Proteinlösung bei 600 nm in einem Spektrofotometer gemessen und mit Hilfe der Extinktion und einer Eichkurve der Proteingehalt berechnet. Die Verdünnungsreihe wurde mit Hilfe von Serumalbumin erstellt.

Nach einem weiteren Erhitzungsschritt auf 95°C (5 min) und zentrifugieren bei (12.000 x g, 5 min, 4°C) wurden 40 µg Gesamtprotein in die Tasche des SDS-Polyacrylamidgels (SDS-PAG) gegeben. Die Gelelektrophorese erfolgte nach Laemmli (1970). Es wurden ein 3 %iges Sammelgel und ein 12 %iges Trenngel gegossen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit 80V im Sammelgel und mit 110V im Trenngel. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Bei jeder Gelelektrophorese lief der Proteinstandard BIO-RAD Dual color (Hemel Hempstead, UK) zur Beurteilung des Molekulargewichts mit.

Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose erfolgte mit dem Semidry-Elektroblotting. Dafür wurde die Nitrocellulose zwischen die Anodengraphitplatte mit Filterpapier und die Kathodengraphitplatte mit Filterpapier positioniert. Der Transfer vom Gel auf die Membran erfolgte über 45 min. bei 40mA/Gel. Die Proteinbanden wurden mit Ponceau-Rot markiert. Diese Markierung wurde bei der u.g. Inkubation wieder entfernt.

Die spezifischen Proteinbanden auf der Nitrocellulosemembran wurden mit dem kommerziellen WesternBreeze® Chemiluminescent Immunodetection Kit (Invitrogen, Paisley, UK) dargestellt. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Dabei wurden zuerst unspezifische Bindungsstellen mit Kasein geblockt (30 min. bei RT). Nach dem Spülen mit Waschlösung erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper für 1h bei 4°C. Es wurden die in Tabelle 3.2 aufgelisteten Antikörper für MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 in der angegebenen Verdünnung eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit der AK-Waschlösung erfolgte für 30 min. die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (an Peroxidase gekoppelter anti Maus IgG-AK). Überschüssige Antikörper wurden durch Spülen mit der AK-Waschlösung entfernt.

**Tabelle 3.2**

**Antikörper gegen MMP-1, MMP-2 sowie TIMP-1 und TIMP-2, die für die Westernblot- Analyse eingesetzt werden.**

| Antikörper  | Verdünnung | Hersteller |
|-------------|------------|------------|
| Anti-MMP-1  | 1:100      | Calbiochem |
| Anti-MMP-2  | 1:100      | Quartett   |
| Anti-TIMP-1 | 1:100      | Calbiochem |
| Anti-TIMP-2 | 1:100      | Calbiochem |

Die Visualisierung der spezifischen Proteinbanden erfolgte mittels Chemilumineszenz. Die Nitrocellulosemembran wurde in 2,375 ml CDP-Star-Substrat und 0,125 ml Nitro-Block II-Lösung für 5 min. entwickelt. Die überflüssige Lösung wurde entfernt und die Nitrocellulose Membran wurde zwischen Overhead-Folien in einer Röntgenkassette auf einen Röntgenfilm (Kodak X-Omat DS) aufgebracht. Der Film wurde durch die Signale der markierten spezifischen

---

Antikörper belichtet und automatisiert entwickelt (45compact Protect Gerätebau GmbH, Deutschland).

### 3.2.3 Zymographie

Die Enzymaktivität von MMP-2 und der anderen Gelatinase MMP-9 wurde mittels der Zymographie bestimmt. Dabei wird Muskelprotein auf ein Gelatine-haltiges Gel aufgetragen. Im Muskelprotein enthaltene Gelatinasen bauen Gelatine im Gel ab und nach der Färbung mit Coomassie brilliant blue fällt die Enzymaktivität als entfärbte Bande auf.

Das native Muskelgewebe wurde auf Eis mit einem Wheaton-Gewebe-Handhomogenisator in 1 % SDS homogenisiert und anschließend zentrifugiert (12.000 x g, 10 min., 4°C). Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit PBS gelöst, die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA Assay (Pierce, Illinois, USA) gemessen (siehe unter 'Westernblot'). Die Auftrennung erfolgte mit einer SDS-PAGE. Es wurden 40 µg Gesamtprotein von Patienten mit DMD und von Normalkontrollen sowie 1 ng rekombinantes MMP-2 und 0,1 ng rekombinantes MMP-9 Antigen (beide Oncogene, San Diego, USA) jeweils in eine Geltasche aufgetragen. Es wurden ein 3 % iges Sammelgel und ein 10 %iges Trenngel gegossen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V im Sammelgel und bei 110 V im Trenngel, das 0,1 % Gelatine enthielt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Das Gel wurde anschließend für zweimal 10 min und einmal 120 min mit 2,5 % Triton X-100, 50 mM Tris pH=7,5 bei RT gewaschen, um SDS zu entfernen und die Gelatinasen zu renaturieren. Zur Aktivierung der Enzyme wurde das Gel in 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris pH=7,5 für 18 h bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Nach der Fixierung in Methanol 40 % und Essigsäure 10 % für 30 min. bei RT wurde das Gel mit 0,5 % Coomassie brilliant blue G-250 für 1 h gefärbt, dann in Aqua bidest. für 2 h gespült und in Essigsäure 7 % entfärbt, bevor es zwischen Cellophan getrocknet wurde.

Die Enzymaktivität wurde durch die farblosen Banden visualisiert, da die Gelatine im Gel durch MMP-2 und MMP-9 abgebaut wurde. Unter den Bedingungen der Zymographie sind auch die Pro-MMPs enzymatisch aktiv. Daher treten für MMP-2 Banden bei 72 und 62 kDa auf und bei MMP-9 Banden bei 92 und 82 kDa.

### **3.2.4 *In situ*-Hybridisierung**

Es wurden die mRNA-Transkripte von Prokollagen I, Prokollagen IV, MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 untersucht. Die Plasmide (Tabelle 3.3) wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Herbst (Berlin) und Herrn Prof. Dr. Schuppan (Berlin/Erlangen) zur Verfügung gestellt. Die Kollagene I und IV sowie MMP-1 und -2 wurden im Plasmid pGEM1 (Promega Biotec) kloniert, TIMP-1 und -2 im Plasmid pAMP1 (BRL-Gibco).

Tabelle 3.3

Charakteristika der eingesetzten mRNA-Sonden; kb: Kilobasen

| Sonde          | Restriktionsenzym<br>(Linearisierung) | RNA-<br>Polymerase<br>(Transkription) | Länge<br>mRNA-<br>Transkripte | des Referenz             |
|----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Prokollagen I  |                                       |                                       |                               | Genovese et al. 1984     |
| -antisense     | HindIII                               | T7                                    | 1,3 kb                        |                          |
| -sense         | EcoRI                                 | SP6                                   |                               |                          |
| Prokollagen IV |                                       |                                       |                               | Philajaniemi et al. 1985 |
| -antisense     | HindIII                               | T7                                    | 0,5 kb                        |                          |
| -sense         | EcoRI                                 | SP6                                   |                               |                          |
| MMP-1          |                                       |                                       |                               | Angel et al. 1987        |
| -antisense     | HindIII                               | T3                                    | 0,7 kb                        |                          |
| -sense         | EcoRI                                 | Sp6                                   |                               |                          |
| MMP-2          |                                       |                                       |                               | Huhtala et al. 1990      |
| -antisense     | EcoRI                                 | SP6                                   | 0,51 kb                       |                          |
| -sense         | HindIII                               | HindIII                               |                               |                          |
| TIMP-1         |                                       |                                       |                               | Herbst et al. 1997       |
| -antisense     | HindIII                               | T7                                    | 0,56 kb                       |                          |
| -sense         | EcoRI                                 | SP6                                   |                               |                          |
| TIMP-2         |                                       |                                       |                               | Herbst et al. 1997       |
| -antisense     | HindIII                               | T7                                    | 0,51 kb                       |                          |
| -sense         | EcoRI                                 | SP6                                   |                               |                          |

Sämtliche Arbeitsschritte der *in situ*-Hybridisierung (ISH) mussten unter RNase-freien Bedingungen erfolgen. Die ISH erfolgte in Anlehnung an die Protokolle von Milani et al. [223].

Die Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen *Hind*III oder *Eco*RI (Tabelle 3.3) zur Umschreibung in die sense-Sonde und die anti-sense-Sonde linearisiert. Dafür wurden sie über Nacht bei 37°C mit dem Restriktionsenzym inkubiert (2,5 µl Restriktionsenzym, 10 µl Plasmid-DNA [1 mg/ml], 2,5 µl Restriktionsenzym-puffer, 10 µl Aqua bidest). Es folgte eine Präzipitation mit 3M Na-Acetat und 100 % Ethanol (30 min bei -70°C); nach der Zentrifugation (12.000 x g 30 min, 4°C) erneute Alkoholpräzipitation (100 % Ethanol) und Zentrifugation, anschließend wurde das Plasmid in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das linearisierte Plasmid wurde in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst (Konzentration 1mg/ml).

Die cDNA wurde mit den RNA-Polymerasen T7, T3 oder SP6 entweder in die RNA Antisense-Sonde oder in RNA sense-Sonde überschrieben (siehe Tabelle 3.3) und dabei mit [<sup>35</sup>S]-Uridin radioaktiv markiert. Dabei wurde das linearisierte Plasmid mit der RNA-Polymerase über 60 min bei 37° inkubiert (0,5 µl linearisiertes Plasmid, 4,5 µl (= 80-100 µCi) [<sup>35</sup>S]-markiertes rUTP, 2 µl 5x Transkriptionspuffer, 0,5 µl 100 mM DTT, 0,5 ml RNAsin, 1 µl 3x Nucleosidtriphosphat (10 mM rCTP, rGTP, rATP), 1 µl RNA-Polymerase, 4,5 µl DEPC). Nach der erneuten Zugabe von 0,5 µl RNA-Polymerase erfolgte eine weitere Inkubation über 30 min.. Anschließend wurde die DNA-Matritze abgebaut (5 µl Hefe-tRNA, 0,5 µl RNAsin, 0,5 µl DNase I) und die nicht eingebauten Nucleotide wurden extrahiert (10 µl 3M Na-Acetat, 74 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, in 100 µl PCI).

Es folgten eine Ethanolpräzipitation, Trocknen mittels Vakuumzentrifuge und Lösen des Transkripts in 5 µl 100 mM DTT und 45µl DEPC-H<sub>2</sub>O.

Zur Verbesserung der Gewebepenetration der Sonde wurden die Transkripte durch eine alkalische Hydrolyse bei 60°C auf 0,15 kb (Kilobasen) verkürzt (Hydrolysepuffer: 4 µl 1M NaHCO<sub>3</sub>, 6 µl 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 5 µl 0,1M DTT, 35 µl DEPC-H<sub>2</sub>O). Die Hydrolysezeit errechnete sich dabei aus der Konstante  $k = 0,11 \text{ kb}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , der Länge des Transkriptes  $L_0$  und der angestrebten Länge des Transkriptes  $L_f$  wie folgt:  $t = (L_0 - L_f) / k \times l_0 \times L_f$ .



---

Entsprechend der Transkriptlängen lag die Hydrolysezeit zwischen 42,4 und 53,6 Minuten. Nach Zugabe eines Stoppuffers erfolgte eine Ethanolpräzipitation. Das Pellet wurde getrocknet und in 30  $\mu\text{l}$  0,1 M DTT/DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert. Die im Szintillationszähler gemessene spezifische Aktivität der Sonden lag bei 1,5-2,4  $\times 10^6$  cpm/  $\mu\text{l}$  Transkript.

Vor der ISH wurden die Gefrierschnitte vorbehandelt, um sowohl eine unspezifische Bindung der Sonde an andere Sequenzen oder eine unspezifische Reaktion mit anderen Zellbestandteilen zu verhindern als auch um die Penetration der Sonde zu verbessern und die spezifische RNA zu stabilisieren. zum

Dazu wurden die Schnitte in 0,2N HCl gespült und mit Pronase (0,125 mg/ml 1xPBS) zur Permeabilisierung des Gewebes inkubiert. Die proteolytische Aktivität der Pronase wurde nach 10 Minuten blockiert (0,1 M Glycin/1xPBS; 4 % PFA/1xPBS) und die Schnitte wurden in Eiswasser fixiert. Zur Verminderung der unspezifischen Hintergrundaktivität erfolgten eine Acetylierung (0,1 M Triethanolamin pH 8,0, mit 1/250 Volumen Essigsäureanhydrid) und anschließend die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Zwischen den Reaktionsschritten wurde mit 1xPBS gespült.

Von jedem Patienten wurden 4 Schnitte/Sonde hybridisiert, 3 Schnitte mit der Antisense-Sonde um unterschiedliche Expositionszeiten untersuchen zu können, 1 Schnitt mit der sense-Sonde als Negativkontrolle. Auf jeden Schnitt wurden 25  $\mu\text{l}$  eines Gemisches aus Sondenmix und Hybridisierungsmix (1ml = 500  $\mu\text{l}$  Formamid, 125  $\mu\text{l}$  10x Salze, 25  $\mu\text{l}$  Hefe-tRNA, 100  $\mu\text{l}$  0,1 M DTT, 250  $\mu\text{l}$  Dextransulfat 50 %) gegeben (1:4). Mit dem Sondenmix wurden 200 000 cpm der [ $^{35}\text{S}$ ]-markierten Sonde pro Schnitt aufgebracht. Die Menge der Sonde errechnete sich nach der im Szintillationszähler gemessenen Aktivität (siehe bei Transkription) und in erster Linie nach der Anzahl der zu untersuchenden Schnitte: 100  $\mu\text{l}$  = 50  $\mu\text{l}$  Formamid deionisiert, 10  $\mu\text{l}$  0,1 M DTT, x  $\mu\text{l}$  Transkriptionslösung, y  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  (x + y = 40  $\mu\text{l}$ ).

---

Bei den im Folgenden kurz dargestellten Waschvorgängen musste nicht mehr unter streng RNase-freien Bedingungen gearbeitet werden, da RNase nur einsträngige RNA abbaut. Alle Schritte wurden unter Temperaturkontrolle in Schüttelwasserbädern durchgeführt. Zum Ablösen der silikonisierten Deckgläschen wurde bei 52°C für 30 min mit der Posthybridisierungs-Waschlösung (50 % Formamid, 1 x Salze, 0,01 M DTT) gespült, dann weitere 4 Stunden in der Posthybridisierungs-Waschlösung bei 52°C. Nach Abkühlung in TES-Lösung auf 37°C Inkubation mit TES/RNase zum Abbau der verbliebenen Einzelstrang-RNA. Nach weiteren Waschvorgängen mit TES (30 min, 37°C) und SSC (45 min bei RT) erfolgten eine Dehydrierung mit aufsteigender Alkoholreihe und das Lufttrocknen der Schnitte.

Zur Darstellung der radioaktiv markierten mRNA-Transkripte wurden die Schnitte in vollständiger Dunkelheit in Fotoemulsion (42°C, Ilford G5 1:1 0,6 M NH<sub>4</sub>-Acetat-Lösung) getaucht, getrocknet und lichtdicht bei 4°C gelagert. Die 3 Chargen mit der Antisense-Sonde wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (Prokollagen I nach 5, 10 und 14 Tagen; Prokollagen IV nach 20, 40 und 60 Tagen; MMP-1, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 nach 20, 30 und 40 Tagen) entwickelt (3 min Kodak D19 Entwickler, 1 % Essigsäure) und fixiert (Kodak Fixierer 3000). Vor dem Einbetten und in Glyceringelatine eingedeckt. mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt

Die ISH erlaubt eine semiquantitative Beurteilung der Menge der mRNA-Transkripte (Milani 1994). Die drei Schnitte/Sonde wurden nach unterschiedlichen Expositionszeiten entwickelt. Es wurde die Charge zur Auswertung herangezogen, die bei möglichst geringer unspezifischer Hintergrundaktivität die kräftigsten spezifischen Signale aufwies. Es wurden am Lichtmikroskop (Vergrößerung 400x) fünf repräsentative Gesichtsfelder pro Präparat ausgezählt. Dabei wurden die Anzahl der Kerne nicht-myogener Zellen, die Anzahl der radioaktiv markierter, d.h. der die spezifische mRNA exprimierenden, "positiven" Zellkerne und die Anzahl der Signalpunkte(grains)/Zellkern ausgezählt. Aus diesen Daten wurden der relative

---

Anteil positiver Zellen, die Gesamtexpression pro 5 ausgezählter Gesichtsfelder/Schnitt und die mittlere Expression positiver Zellkerne berechnet.

Schnitte mit zu hoher Hintergrundaktivität, die keine sichere Zuordnung von Signalpunkten zu Zellkernen erlaubt, konnten nicht ausgewertet werden. Als Negativkontrollen dienten die mit der sense-Sonde hybridisierten Schnitte.

#### Doppelmarkierung

Bei der Doppelmarkierung erfolgte unmittelbar vor der ISH eine immunhistochemische Färbung mit der APAAP-Methode. Die Doppelmarkierung diente der Identifizierung solcher Zellpopulationen, die die mit der ISH dargestellte RNA exprimieren. Die Immunhistochemie musste dabei auch unter möglichst RNase-freien Bedingungen durchgeführt werden. Dem Verdünnungspuffer für die Antikörper wurde zur Inhibition von RNase 5000 IU/ml Heparin und 0.6 mg/ml Hefe-tRNA als Substrat zugesetzt. Durch die vorangestellte immunhistochemische Färbung nahm die Anzahl der spezifischen Transkripte bei der Doppelmarkierung ab. Zellen, die nur eine leichte Vermehrung von spezifischen mRNA-Transkripten aufwiesen, konnten daher bei der Doppelmarkierung übersehen werden.

Es wurden Antikörper gegen Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und regenerierende und reife Muskelzellen eingesetzt, deren optimale Konzentration durch eine Verdünnungsreihe ermittelt wurde (Tabelle 3.4). Die immunhistochemische Darstellung der Basalmembran erfolgte zur Abgrenzung von Satellitenzellen, die im Gegensatz zu randständig gelegenen Muskelzellkernen vollständig von der Basalmembran umschlossen sind. Die ISH wurde dann unmittelbar im Anschluss an die immunhistochemische durchgeführt (siehe oben).

Tabelle 3.4

Antikörper zur immunhistologischen Darstellung der mRNA exprimierenden Zellen und der Basalmembran bei der Doppelmarkierung Immunhistologie/*in situ*-Hybridisierung

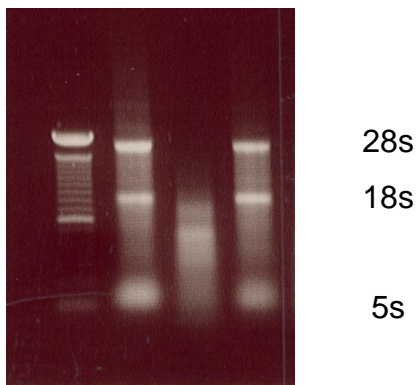
| Antikörper                       | Verdünnung | markierte Zellen/Strukturen                  | Hersteller |
|----------------------------------|------------|--|------------|
| Anti-CD31                        | 1:50       | Endothelien                                  | Dako       |
| Anti-CD68                        | 1:50       | Makrophagen                                  | Dako       |
| Anti-Vimentin                    | 1:1000     | Fibroblasten,<br>regenerierende Muskelzellen | Dako       |
| Anti-Aktin                       | 1:25       | Muskelzellen                                 | Dako       |
| Anti-Desmin                      | 1:50       | regenerierende Muskelzellen                  | Dako       |
| Anti-Laminin<br>$\alpha$ 2-Kette | 1:200      | Basalmembran                                 | Chemicon   |

### 3.2.5 Quantitative mRNA-Bestimmung

Das sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefrorene Muskelgewebe wurde in gefrorenem Zustand zerkleinert und in einem Wheaton-Gewebe-Handhomogenisator in Tri Reagent (1 ml/50/100 mg Gewebe) homogenisiert.

Das sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefrorene Muskelgewebe wurde in gefrorenem Zustand zerkleinert und in einem Wheaton-Gewebe-Handhomogenisator in TRI Reagent<sup>TM</sup> (Sigma, Saint Louis, USA) (1 ml/50-100 mg Gewebe) für 1-2 min. homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und für 5 min auf Eis stehen gelassen, nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform 15 sec kräftig per Hand geschüttelt, weitere 2-15 min stehen gelassen und zentrifugiert (12.000 x g, 15 min, 4°C). Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt, es wurde

0,5 ml Isopropanol dazugegeben, vorsichtig vermischt und über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Der Ansatz wurde zentrifugiert ( $12.000 \times g$ , 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), der Überstand verworfen und das RNA Pellet wurde 2 x mit je 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde bei  $55^{\circ}\text{C}$  luftgetrocknet und anschließend in DEPC Wasser gelöst (10-15 min,  $55^{\circ}\text{C}$ ). Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde spektroskopisch ermittelt (BioPhotometer, Fa. Eppendorf, Hamburg). Die Qualität der RNA wurde mittels Elektrophorese (1 % Agarose-Gel, 0,5-1  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA/Spur) überprüft (Abbildung 3.1).



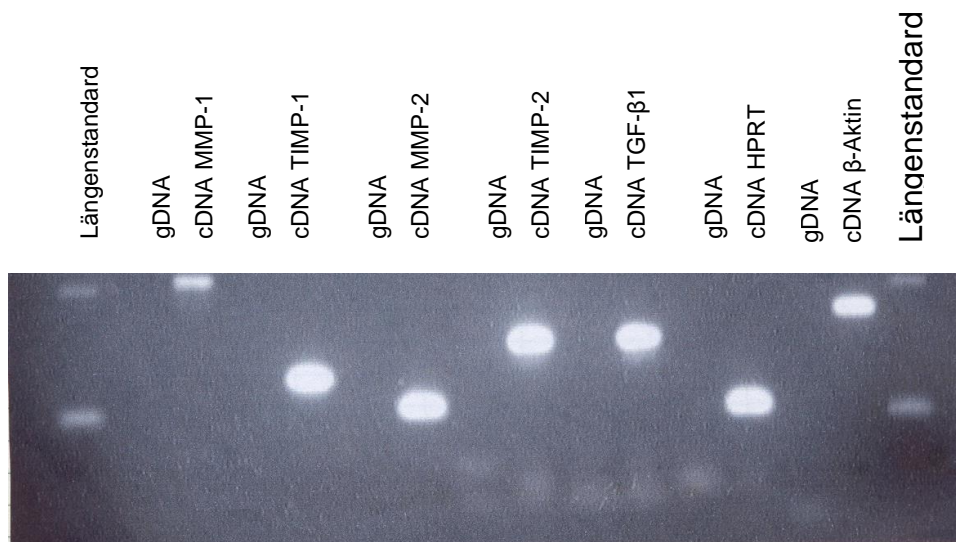
**Abbildung 3.1**

**Agarosegelelektrophorese von Gesamt-RNA aus humaner Skelettmuskulatur mit der 5S Bande, der 18S Bande und der 28S Bande; S: Svedberg-Einheiten.**

Für die Umschreibung in cDNA mit dem ThermoScript<sup>TM</sup> RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) wurden 2  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA eingesetzt. Die Kontrolle der Umschreibung erfolgte mit einer PCR für das *HPRT*-Gen.

Die Quantifizierung von TGF $\beta$ 1-cDNA-Transkripten wurde mit einem 5'-Nuklease-Assay in Kombination mit einer TaqMan<sup>®</sup> Sonde (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Um zu verhindern, dass genomische DNA amplifiziert wird, wurde das TaqMan<sup>®</sup>-System für TGF $\beta$ 1 (GenBank NM\_000660) so gestaltet, dass der Vorwärts-Primer 5'-ACA TTG ACT TCC GCA AGG ACC-3' (S550) und der

Rückwärtsprimer 5'- CCC GGG TTA TGC TGG TTG TA-3' (S551) gegenüber einem großen Intron von 1749 bp lagen. Zusätzlich wurde die TaqMan®-Sonde FAM-ACG CAG TAC AGC AAG GTC CTG GCC-X-TAMRA (S552) so gestaltet, dass sie mit dem Grenzbereich Exon 6/ Exon 7 hybridisiert, wodurch jede Hybridisierung mit einem PCR-Produkt genomischer DNA nahezu ausgeschlossen wird. Um sicherzustellen, dass ausschließlich cDNA in unserem System amplifiziert werden kann, wurde die PCR mit dem Primer Set S550-S551 sowohl mit cDNA als auch mit genomischer DNA durchgeführt. Mit genomischer DNA waren nach 45 PCR-Zyklen keine Signale nachweisbar (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2**

Darstellung der spezifischen PCR-Produkte der cDNA von MMP-1, TIMP-1, MMP-2, TIMP-2, TGF-β1, HPRT und β-Aktin; gDNA: genomische DNA, jeweils als Negativkontrolle.

Für die Quantifizierung wurde durch Einklonieren [TA-cloning] des S550-S551 PCR-Produktes (=151 bp) in den pGEM-T Vektor (Promega, Mannheim) ein interner Standard hergestellt. Es wurde eine Verdünnungsreihe des Plasmids von  $10^7$  Kopien/ $\mu$ l bis 1 Kopie/ $\mu$ l hergestellt. Die PCR wurde mit dem ABI PRISM 7700

Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) mit einer Taq-Polymerase (Invitrogen) durchgeführt. Nach Denaturation bei 95°C über 10 min folgten 45 Zyklen in jeweils zwei Schritten: Denaturierung bei 95°C für 30 sec und Annealing/Extension bei 65°C für 60 sec. Die TaqMan®-Daten wurden mit dem "Sequence Detector" v1.6.3 Software (Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgewertet und auf die Werte der Kalibrierungskurve bezogen.

Die Überlegungen zu der Gestaltung der TaqMan®-Systeme für die anderen Gene entsprachen den bereits geschilderten Kriterien soweit wie möglich.

Es wurden folgende Sequenzen verwendet:

MMP1 (Genbank NM\_002421) PCR Produkt = 206 bp, vorwärts 5'-CAC AAA TCC CTT CTA CCC GGA-3' (S381), rückwärts 5'-TTC TAG GGA AGC CAA AGG AGC-3' (S374), TaqMan®-Sonde FAM-TGT GCT ACA CGG ATA CCC CAA GGA CAT C -X-TAMRA (S407);

TIMP1 (Genbank NM\_003254) PCR Produkt = 122 bp, vorwärts 5'-TGA GAT CAA GAT GAC CAA GAT GTA TAA A-3' (S607), rückwärts 5'-GGT TGT GGG ACC TGT GGA AGT-3' (S377), TaqMan®-Sonde FAM-CGC CAT GGA GAG TGT CTG CGG A-X-TAMRA (S409);

MMP2 (Genbank NM\_004530) PCR Produkt = 101 bp, vorwärts 5'-ATA ACC TGG ATG CCG TCG TG-3' (S457), rückwärts 5'-CAC GCT CTT CAG ACT TTG GTT CT-3' (S458), TaqMan®-Sonde FAM-TGC AGG GCG GCG GTC ACA-X-TAMRA (S459);

TIMP2 (Genbank NM\_003255) PCR Produkt = 151 bp, vorwärts 5'-CAC CAC CCA GAA GAA GAG CC-3' (S454); rückwärts 5'-CTG GTG CCC GTT GAT GTT C-3' (S455), TaqMan®-Sonde FAM-CGA GTG CAA GAT CAC GCG CTG C-X-TAMRA (S456)

Als interner Standard sollte ein sogenanntes "house-keeping" Gen als Bezugsgröße parallel mitamplifiziert werden. Wir haben das Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT*)-Gene (GenBank NM\_000194) gewählt.

---

Das HPRT TaqMan®-System wurde wie folgt gestaltet: PCR Produkt = 101 bp, vorwärts 5'-GAG GAT TTG GAA AGG GTG TTT ATT C-3' (S556), rückwärts 5'-ACA ATG TGA TGG CCT CCC A-3' (S557), TaqMan®-Sonde FAM-CAT GGA CTA ATT ATG GAC AGG ACT GAA CGT CTT G-X-TAMRA (S558).

### 3.2.6 Serologische Untersuchungen

Die Serumspiegel der fibrillären Kollagene Prokollagen I (PICP) und Prokollagen III (PIIINP) wurden mit dem kommerziellen Farnos' Radioimmunoassay (Farnos Diagnostica, Turku, Finland) bestimmt. Als Normalwerte für PICP wurden die Daten von Saggese et al. [282] und für PIIINP die von Trivedi et al. [319] verwandt. Das an der Basalmembran lokalisierte Glykoprotein Laminin wurde mit dem spezifischen Radioimmunoassay nach Brocks et al. [43] gemessen, als normale Referenzwerte dienten die Ergebnisse von Danne [78]. Die Serumspiegel von TIMP-1 und des im Bereich von Makrophageninfiltraten hochregulierten Glykoproteins Tenaszin wurden beide ebenfalls mit einem kommerziellen Immunoassay (Bayer AG, Uerdingen, BRD) gemessen, als Normalwerte dienten für TIMP-1 die Werte nach Hörstrup et al. [154], für Tenaszin wurden die die Daten von Ropers et al. [280] verwandt.

Die Bestimmung des Filament-bildenden Kollagen VI erfolgte mit dem modifizierten ELISA nach Schuppan et al. [284] und Shahin M et al. [289]. Die Normalwerte für das Kindes- und Jugendalter wurden von Gerling et al. [115] ermittelt.



### 3.2.7 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen, der semiquantitativen Auswertung der *in situ*-Hybridisierung und der quantitativen RT-PCR wurden als Median mit Interquartilen (25-75 %) und Interdecilen (10-90 %)-Abstände dargestellt, da nicht von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden konnte. Die Unterschiede zwischen den DMD-Patienten und den Normalkontrollen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Rang-Summen-Test berechnet. Unterschiede der verglichenen Mediane galten bei  $p < 0,01$  als signifikant.

## **4 Ergebnisse**

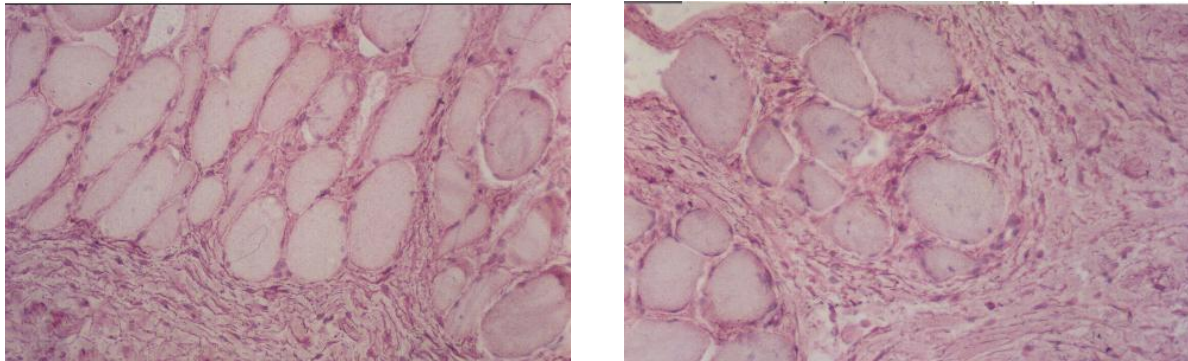
### **4.1 Immunhistochemische Untersuchungen**

Es wurden verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) immunhistochemisch dargestellt.

#### **4.1.1 Kollagene und Glykoproteine**

Von den Kollagenen wurden die fibrillären Kollagene I und III untersucht, das an der Basalmembran lokalisierte Kollagen IV, das Filament-bildende Kollagen VI und das FACIT (Fibril-associated collagens with interrupted triple helices)-Kollagen XIV (Undulin).

Die fibrillären Kollagene I und III waren entsprechend des Ausmaßes der Muskelfibrose in der endo- und perimysialen ECM vermehrt nachweisbar. Sie waren homogen im gesamten endo- und perimysialen Raum verteilt und wiesen die charakteristische fibrilläre Struktur auf. (siehe unter Abbildung 4.1).

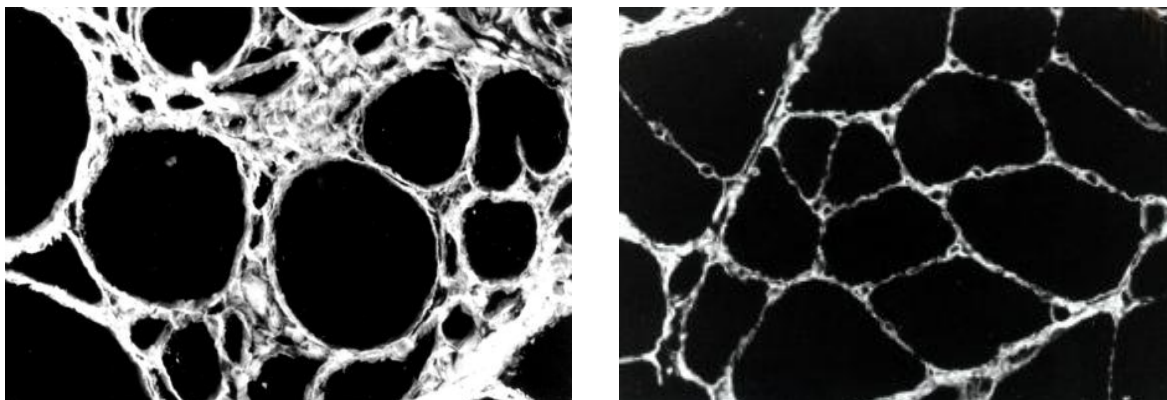


**Abbildung 4.1 Immunhistochemische Darstellung von Kollagen I und Kollagen III im DMD-Muskel (APAAP-Methode).**

**a Antikörper gegen Kollagen I, x 200.**

**b Antikörper gegen Kollagen III, x 200.**

Kollagen IV war kontinuierlich entlang der Basalmembran der Muskelzellen nachweisbar. Das ubiquitär vorhandene Kollagen VI war entsprechend der Verteilung von Kollagen I und III homogen in allen Bereichen der endo- und perimysialen ECM dargestellt (Abbildung 4.2).

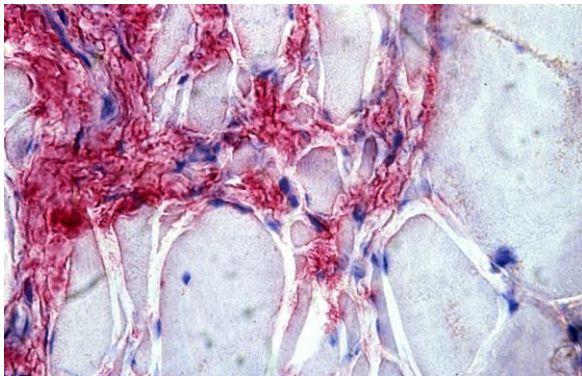


**Abbildung 4.2 Immunhistochemische Darstellung von Kollagen VI im Muskel.**

**a DMD-Muskel, Immunhistochemie (Immunfluoreszenz), Antikörper gegen Kollagen VI, x 400; Darstellung der Basalmembran und der vermehrten endo- und perimysialen ECM.**

**b Normalkontrolle, Immunhistochemie (Immunfluoreszenz), Antikörper gegen Kollagen VI, x 400; Darstellung der Basalmembran und der physiologischen Bindegewebsstrukturen.**

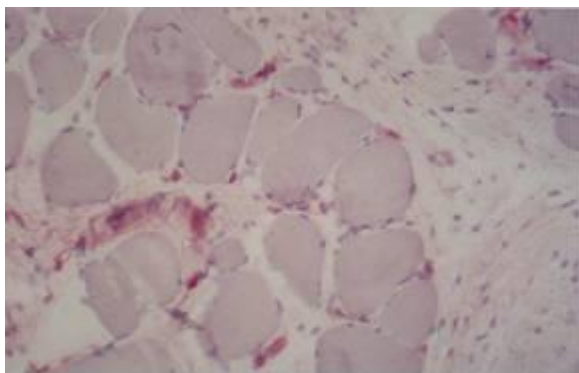
Kollagen XIV wurde hier erstmals am DMD-Muskel dargestellt. Es trat assoziiert mit reifen Kollagenfibrillen auf. Es wurde in der endo- und perimysialen ECM nachgewiesen, wobei eine flächige Darstellung ähnlich der des Kollagen VI imponierte, ohne dass hier die Basalmembran angefärbt wurde (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3**

**Immunhistochemische Darstellung (APAAP-Methode) von Kollagen XIV, DMD-Muskel, x 400. Kollagen XIV ist an die fibrillären Kollagene in der endo- und perimysialen ECM gebunden, die Basalmembran ist nicht dargestellt.**

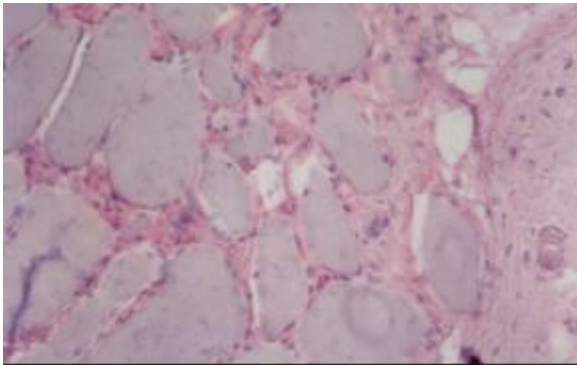
Das Glykoprotein Tenascin C wurde fokal im Endomysium nekrotisierender Muskelfasern im Bereich zellulärer Infiltrate nachgewiesen (Abbildung 4.4).



**Abbildung 4.4**

**Immunhistochemische Darstellung (APAAP-Methode) von Tenascin C, DMD-Muskel, x 200. Tenascin C ist überwiegend endomyseal im Bereich zellulärer Infiltrate nachweisbar.**

Fibronektin war mit einer fleckig-netzförmigen Struktur in der endo- und perimysialen ECM dargestellt und war entsprechend der Proliferation der ECM vermehrt. (Abbildung 4.5)



**Abbildung 4.5**

**Immunhistochemische Darstellung (APAAP-Methode) von Fibronektin, DMD-Muskel, x 200. Fibronektin ist netzförmig in der endo- und perimysialen ECM nachweisbar, z.T. zellulär gebunden.**

Elastin war als Ausdruck reifen Bindegewebes mit normaler Struktur und in normaler Lokalisation nachweisbar. Entsprechend der Zunahme der ECM war auch Elastin vermehrt.

#### **4.1.2 Desmin, Vimentin, NCAM**

Der ursprünglich zur Markierung neuronaler Zellen verwendete Antikörper (AK) gegen N-CAM (neuronal cell adhesion molecule) ist auch zur Markierung regenerierender und degenerierender Muskelfasern geeignet [236] (Abbildung 4.6 und 4.7). Es handelt sich um ein Adhäsionsprotein, das in verschiedenen Isoformen vorkommt.

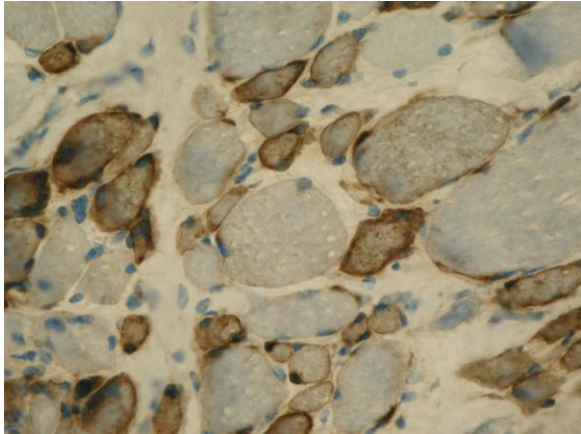
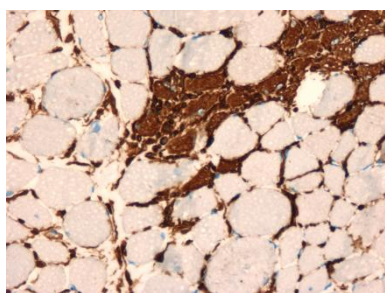


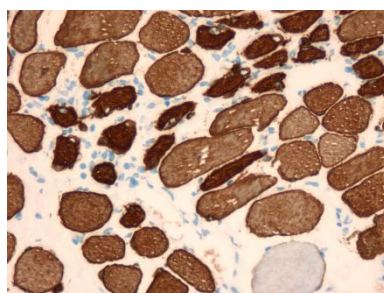
Abbildung 4.6

Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen NCAM (neuronal cell adhesion molecule) im DMD-Muskel, x 400. Es ist eine intensive Färbung überwiegend kleinerer Fasern erkennbar.

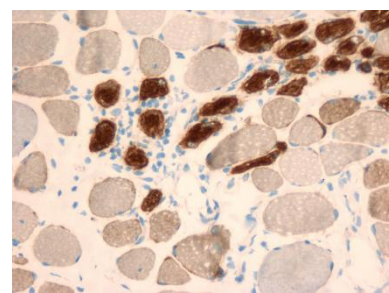
Wird in einer Muskelfaser neben N-CAM auch Desmin und Vimentin nachgewiesen spricht dies dafür, dass es sich um eine regenerierende Faser handelt [236]. Werden in einer Vimentin-negativen Faser N-CAM und Desmin nachgewiesen, handelt es sich um eine degenerierende Faser (Abbildung 4.7).



a Vimentin Antikörper



b Desmin Antikörper



c NCAM Antikörper

Abbildung 4.7

Serienschnitte eines DMD-Muskels, immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Vimentin, Desmin und NCAM (neuronal cell adhesion molecule), x 200; Darstellung einer Gruppe kleiner regenerierender Muskelfasern, die positiv für Vimentin, Desmin und NCAM sind.

Im DMD-Muskel konnten mit dieser AK-Kombination Zeichen der Regeneration auch in weit fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung nachgewiesen werden.

#### 4.1.3 MMP-1

Mit den Antikörpern gegen MMP-1 und MMP-2 wurden sowohl die enzymatisch inaktiven Pro-MMPs als auch die proteolytisch aktivierten Formen abgebildet.

MMP-1 wurde in Zellen der endo- und perimysialen ECM dargestellt (Abbildung 4.8), bei denen es sich ganz überwiegend um Fibroblasten gehandelt hat. Mit dem MMP-1 AK wurde zum Teil auch die Basalmembran angefärbt.

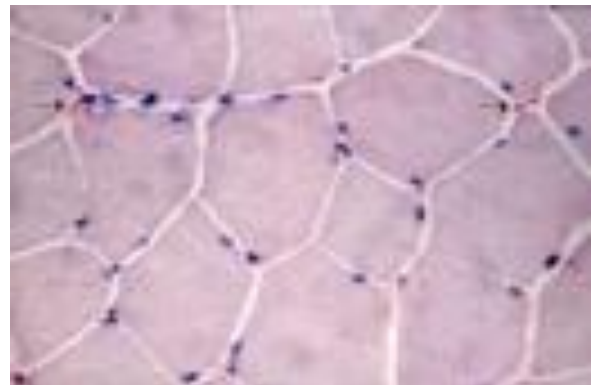
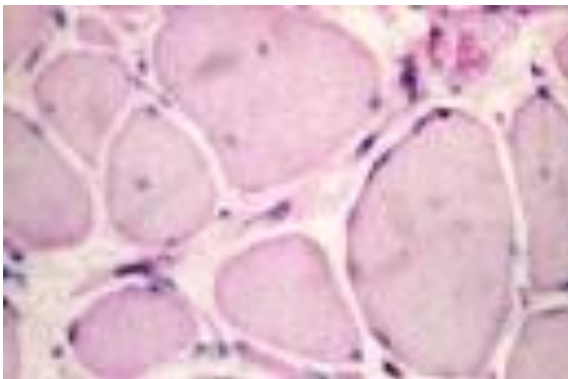


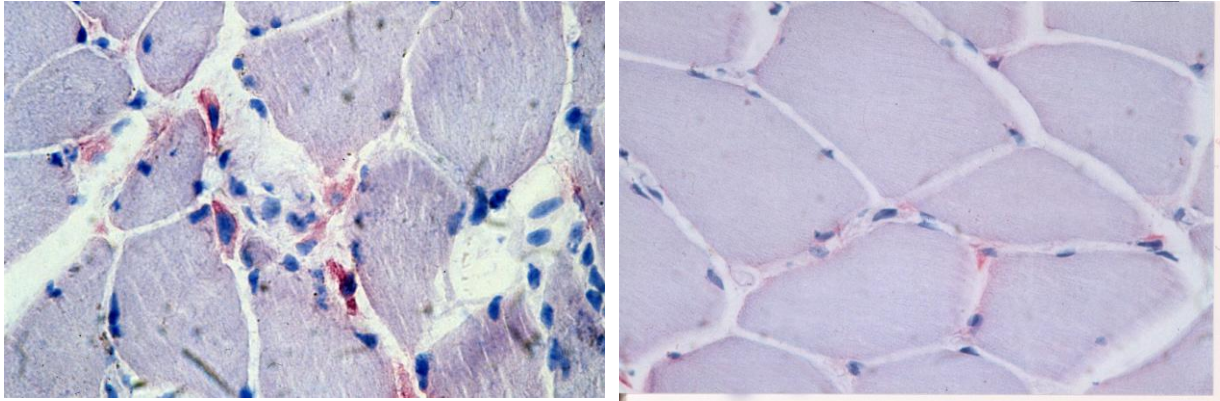
Abbildung 4.8 Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern (AK) gegen MMP-1.

a DMD-Muskel; MMP-1 wird in Zellen der ECM und entlang der Basalmembran angefärbt, x 400.

b Normalkontrolle; Anfärbung einzelner Zellen der ECM, x 400.

#### 4.1.4 MMP-2

Mit dem MMP-2 Antikörper wurden Zellen der endo- und perimysialen ECM angefärbt (Abbildung 4.9), Lokalisation und Morphologie weisen darauf hin, dass es sich überwiegend um endomyseal gelegene Fibroblasten handelt.



**Abbildung 4.9 Immunhistochemische Darstellung von MMP-2.**

**a DMD-Muskel, MMP-2-AK, x 400. Vermehrte Darstellung MMP-2 positiver Zellen im Bereich zellulärer Infiltrate.**

**a Normalkontrolle, MMP-2-AK, x 400. Darstellung einzelner MMP-2 positiver endomysealer Zellen.**

#### **4.1.5 TIMP-1**

Die Markierung mit AK gegen TIMP-1 und TIMP-2 ergab sehr unterschiedliche Verteilungsmuster der beiden Proteine. Mit dem TIMP-1-AK wurde die gesamte endo- und perimysiale ECM angefärbt. Dieser Befund war auch bei Verkürzung der Inkubationszeit und verkürzter Entwicklungsdauer reproduzierbar und spezifisch. Im Kontrollmuskel waren keine eindeutig TIMP-1 positiven Strukturen darstellbar (Abbildung 4.10)



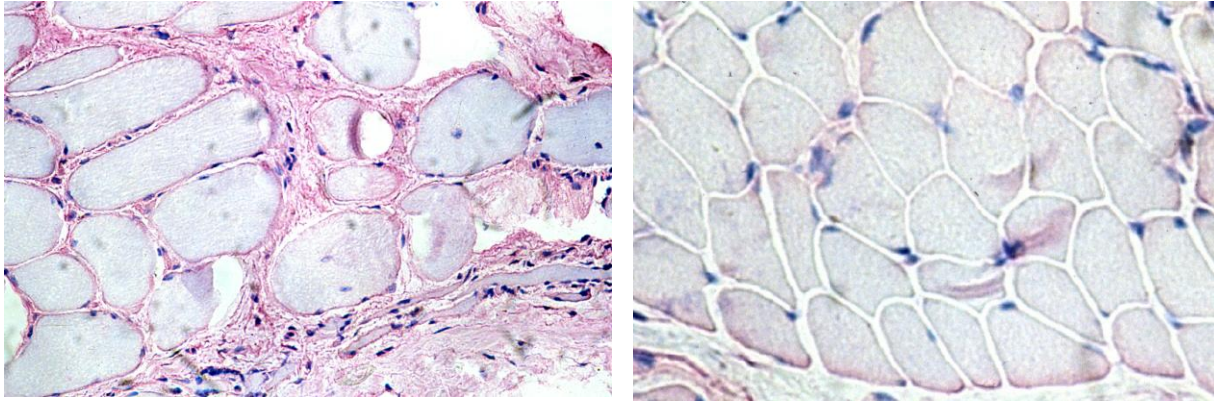


Abbildung 4.10 Immunhistochemische Darstellung von TIMP-1 (APAAP-Methode) im Muskel.

a DMD-Muskel, TIMP-1-AK, x 200; Anfärbung in der gesamten endo- und perimysialen ECM.

b Normalkontrolle, TIMP-1-AK, x 200; keine eindeutig, TIMP-1-positive Strukturen.

#### 4.1.6 TIMP-2

Mit den TIMP-2-AK wurden einzelne endomyseale Fibroblasten in der ECM markiert. (Abbildung 4.11)

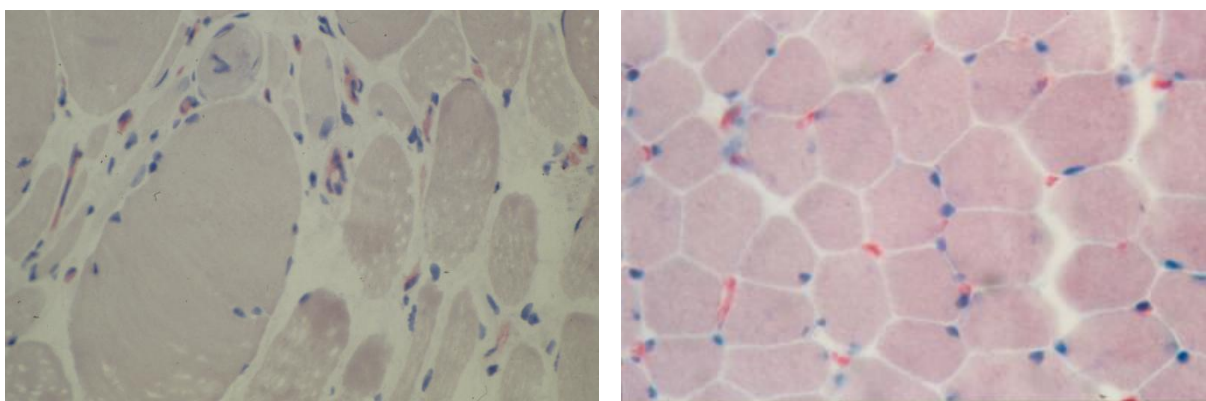


Abbildung 4.11 Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern TIMP-2 (APAAP-Methode) im Muskel.

a DMD-Muskel, TIMP-2, x 200. Darstellung einzelner Fibroblasten in der ECM.

b Normalkontrolle, TIMP-2, x 200. Darstellung weniger endomyseal gelegener Zellen.

## 4.2 Westernblot

Im Westernblot konnten MMP-1, MMP-2 und TIMP-1 reproduzierbar nachgewiesen werden. Die Darstellung von TIMP-2 ist trotz des Einsatzes verschiedener kommerzieller Antikörper im Muskelgewebe nicht gelungen.

### 4.2.1 MMP-1

MMP-1 war im DMD-Muskel in geringerer Menge nachweisbar, die dem Proenzym Pro-MMP-1 entsprechende Bande bei 52 kDa erschien schwächer ausgeprägt als im Kontrollmuskel, die dem aktiven Enzym entsprechende Bande bei 43 kDa war nicht nachweisbar (Abbildung. 4.12).

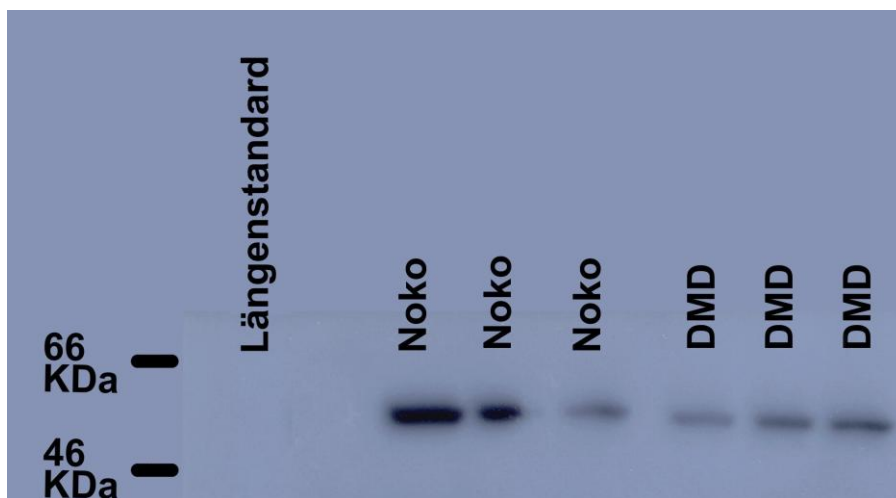


Abbildung 4.12

Westernblot zum Nachweis von MMP-1 im Muskel. Spur 2-4: Normalkontrollen; Spur 5-7: DMD-Muskeln; Längenstandard (Rainbow Marker, Amersham, UK); die Bande ist im DMD-Muskel schwächer ausgeprägt.

#### 4.2.2 MMP-2

MMP-2 war im DMD-Muskel vermehrt vorhanden, wobei überwiegend das inaktive Proenzym Pro-MMP-2 bei 72 kDa nachgewiesen wurde. Die aktive Form des Enzyms bei 62 kDa lag in geringer Menge vor und war in der Normalkontrolle kaum nachweisbar. (Abbildung 4.13).

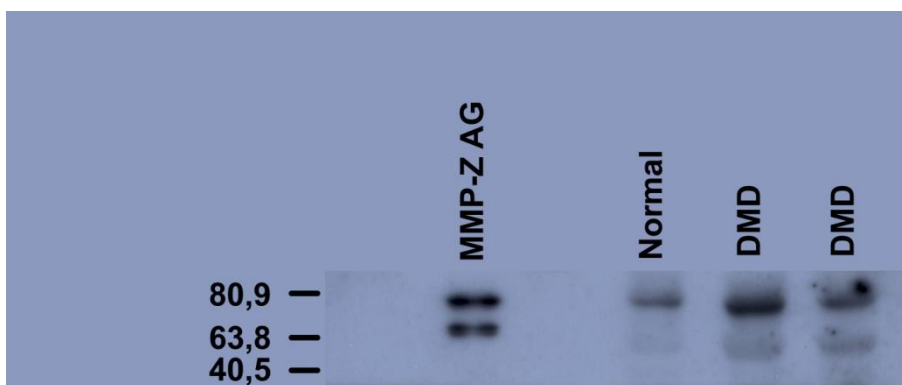


Abbildung 4.13

Westernblot zum Nachweis von MMP-2 im Muskel. Spur 1: MMP-2 Antigen, Spur 4: Normalkontrollen, Spur 5+6: DMD-Muskeln. Längenstandard (Rainbow Marker, Amersham, UK).

### 4.2.3 TIMP-1

Die TIMP-1 Bande bei 28 kDa war im DMD-Muskel deutlich stärker ausgeprägt als bei den Normalkontrollen (Abbildung 4.14).

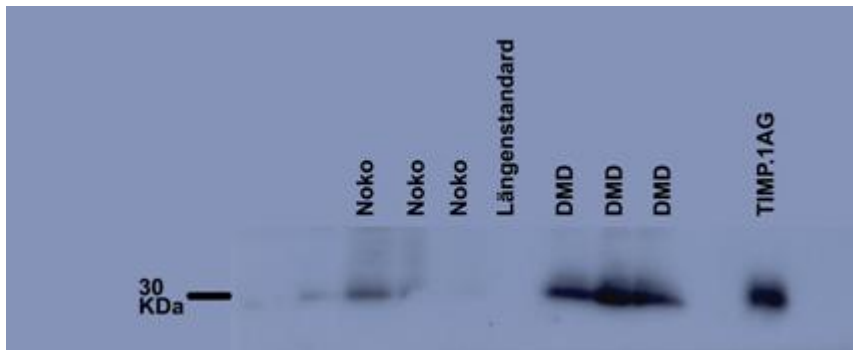


Abbildung 4.14

Westernblot zum Nachweis von TIMP-1 im Muskel. Spur 1-3: Normalkontrollen, Spur 5-7: DMD-Muskeln, Spur 9: TIMP-1-Antigen, Spur 4: Längenstandard (Rainbow Marker, Amersham, UK).

### 4.3 Zymographie

Bei der Zymographie wurden durch die Versuchsbedingungen auch die Pro-MMPs aktiviert, die Gelatine abbauen können. Es traten deshalb sowohl die Banden für die in vivo inaktive Form (MMP-2 bei 72 kDa, MMP-9 bei 92 kDa) als auch für die biologisch aktive Form auf (MMP-2 bei 62 kDa, MMP-9 bei 82 kDa). In der Spur 2, in der das MMP-2 Antigen aufgetragen wurde, war eine zusätzliche Bande bei 46 kDa nachweisbar, die einer bekannten Isoform des aktivierten MMP-2 entspricht. Die Enzymaktivität der Gelatinase MMP-2 war im Muskel von Patienten mit DMD gesteigert (Abbildung 4.15), wobei überwiegend Pro-MMP-2 vorlag. Im gesunden Muskel war in deutlich geringerer Menge ausschließlich Pro-MMP-2 nachweisbar, bei 62 kDa war keine Bande erkennbar. Auch die MMP-9 Aktivität (Bande bei 82 kDa) war im Muskel von DMD-Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen verstärkt.

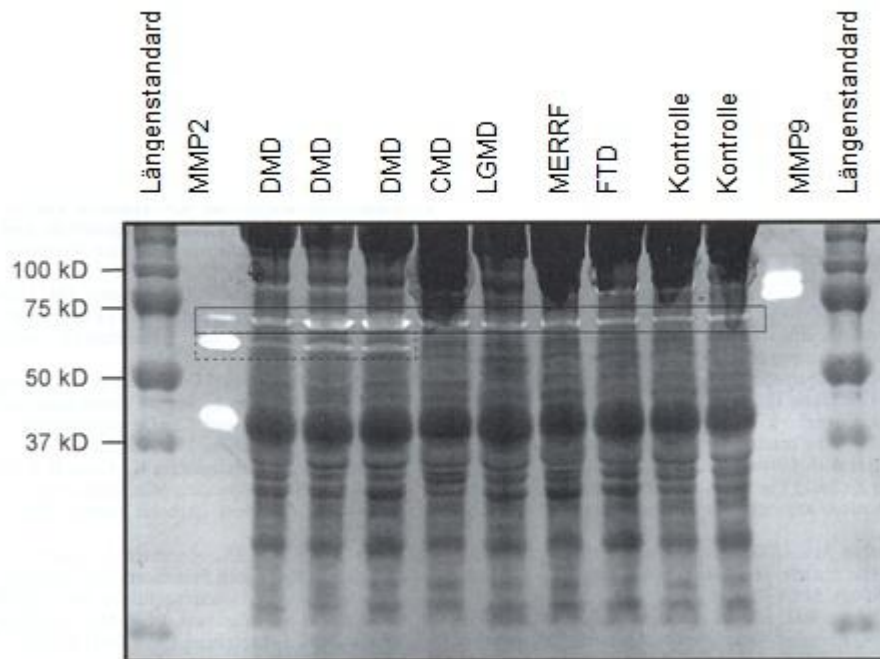


Abbildung 4.15

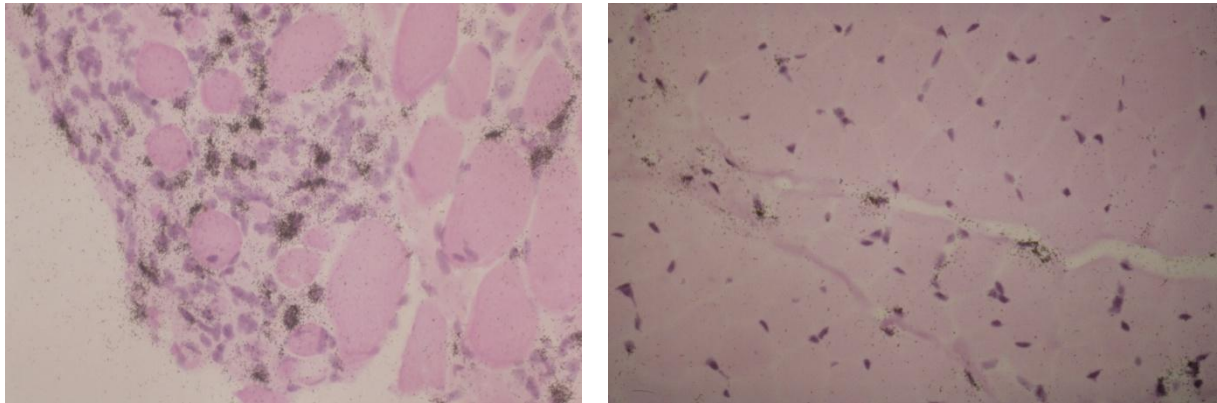
Zymographie von drei DMD-Muskeln (Spur 3-5), vier pathologischen Kontroll-Muskeln (Spur 6-9) und 2 Normalkontrollen (Spur 9,10); Spur 1: Längenstandard, Spur 2: MMP-2 Antigen; Spur 12: MMP-9 Antigen; die Enzymaktivität von MMP-2 ist im DMD-Muskel erhöht. Die pro-MMP-2 Bande (geschlossene Linie) erscheint bei den DMD-Muskeln stärker ausgeprägt als in den pathologischen und den normalen Kontroll-Muskeln; die aktivierte Form von MMP-2 (gestrichelte Linie, Bande bei 62 kDa) ist nur im DMD-Muskel nachweisbar; MERRF: Myoklonus-Epilepsie mit Ragged-Red-Fibres; FTD: kongenitale Myopathie mit Faser-Typen-Dysproportion; LGMD: Gliedergürtelmuskeldystrophie; CMD: kongenitale Muskeldystrophie.

#### **4.4 *In situ*-Hybridisierung**

Bei der *in situ*-Hybridisierung (ISH) konnten mit allen <sup>35</sup>S-markierten Sonden spezifische Signale über Zellkernen nachgewiesen werden, die mRNA-Transkripte wurden in nicht-myogenen Zellen lokalisiert. Mit der Doppelmarkierung (IH und ISH) konnte gezeigt werden, dass es sich dabei ganz überwiegend um Vimentin-positive Zellen handelt, die anhand der Morphologie und Lokalisation als Fibroblasten identifiziert werden konnten. Die Hybridisierung mit der sequenzhomologen Sense-Sonde als Negativkontrolle ergab in keinem Fall eine relevante Menge falsch-positiver Signale, die die Auswertung beeinträchtigt hätten. Die Zahl der mRNA-Transkripte wurde semiquantitative analysiert.

##### **4.4.1 Prokollagen I**

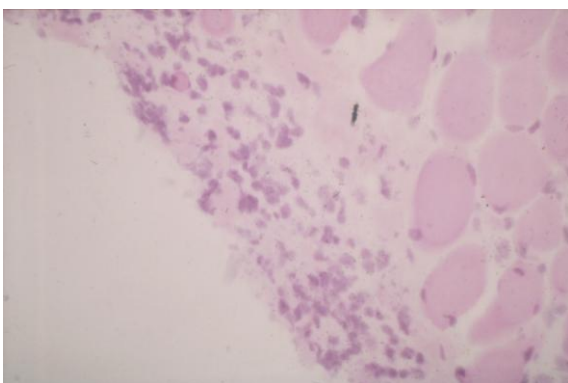
Die Anzahl der mRNA-Transkripte von Prokollagen I war besonders fokal im Bereich zellulärer Infiltration und Faserdegeneration/-regeneration stark erhöht (Abbildung 4.16a), aber auch in Abschnitten ohne diese Umbauvorgänge wurden Zellen der ECM mit vermehrten mRNA-Transkripten nachgewiesen. Bei Normalkontrollen wurden nur geringe Mengen mRNA-Transkripte gefunden (Abbildung 4.16b).



**Abbildung 4.16** *In situ*-Hybridisierung mit  $^{35}\text{S}$ -markierter RNA Sonde für Prokollagen I.

- a** DMD-Muskel, starke mRNA-Expression mit der Antisense-Sonde in Kernen nicht-myogener Zellen, x 200.
- b** Normalkontrolle mit der Antisense-Sonde, geringe Expression von Prokollagen I mRNA in endomyseal gelegenen Zellkernen, x 200.

In Abbildung 4.17 wird gezeigt, dass bei der Hybridisierung mit der Sense-Sonde keine unspezifischen Hintergrundsignale auftreten, die die Auswertung beeinträchtigen würden.

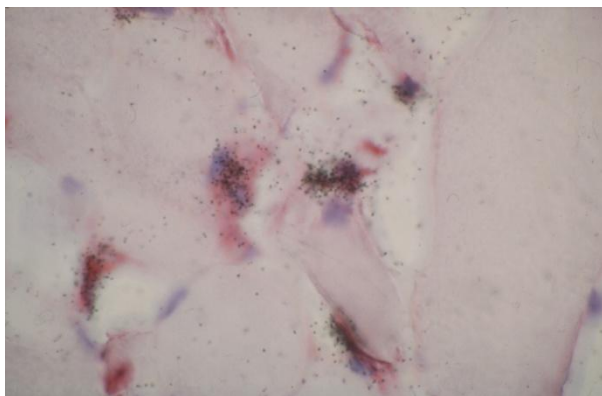


**Abbildung 4.17**

*In situ*-Hybridisierung mit  $^{35}\text{S}$ -markierter RNA Sonde für Prokollagen I; DMD-Muskel, Negativ-Kontrolle mit einer Sense-Sonde, die keine spezifischen Signale ergibt, x 200.



Anhand der Doppelmarkierung mit Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierung wurde gezeigt, dass die mRNA-Transkripte in Vimentin positiven Zellen exprimiert werden (Abbildung 4.18). Dabei handelt es sich ganz überwiegend um endo- oder perimysial gelegene Fibroblasten.



**Abbildung 4.18**

**Doppelmarkierung IH/ISH mit Antikörpern gegen Vimentin (CD68) und der Antisense-Sonde für Prokollagen I mRNA, x 1000. Die spezifischen mRNA-Transkripte werden in CD68 positiven Zellen nachgewiesen.**

Bei der semiquantitativen Analyse wurde die Anzahl der Zellen, in denen die spezifischen mRNA-Transkripte nachgewiesen wurden („positive Zellen“) und die Stärke der Expression der einzelnen mRNA-positive Zelle ausgezählt. Aus diesen Werten konnten der relative Anteil mRNA positiver Zellen und die Expressionsstärke pro Schnitt errechnet werden.

Die Zahl der mRNA-Transkripte von *Prokollagen I* war im DMD-Muskel sowohl gegenüber dem SMA-Muskel ( $p < 0,005$ ) als auch gegenüber den Normalkontrollen signifikant erhöht ( $p < 0,0003$ ) (Abbildung 4.19). Dies betraf sowohl die Transkripte/positiver Zelle als auch den Anteil positiver Zellen/Schnitt.

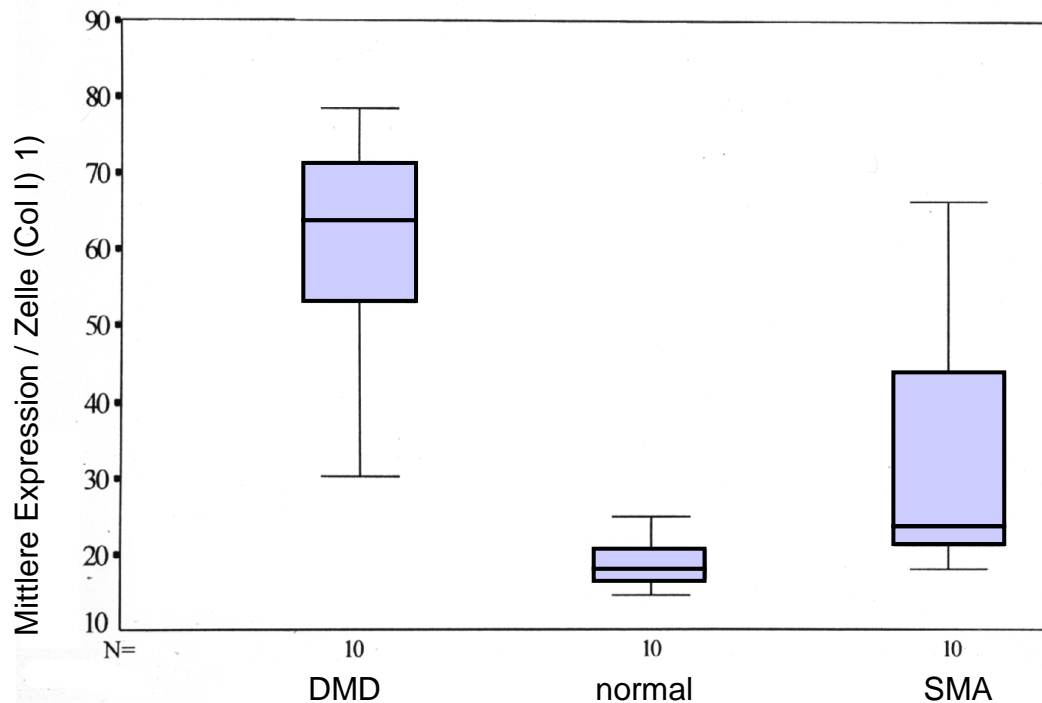


Abbildung 4.19

Graphische Darstellung der semiquantitativen Analyse der mRNA-Transkripte von Prokollagen I im Muskel von DMD-Patienten, Patienten mit spinaler Muskelatrophie und Normalkontrollen. Die Expression im DMD-Muskel ist gegenüber den Normalkontrollen ( $p < 0,0003$ ) und gegenüber den SMA-Muskeln ( $p < 0,005$ ) signifikant erhöht.

#### 4.4.2 Prokollagen IV

Die Expression der mRNA-Transkripte von Prokollagen IV war im DMD-Muskel verstärkt (Abbildung 4.20). Der Unterschied zu den Normalkontrollen war weniger ausgeprägt als bei Prokollagen I. Sowohl der Prozentsatz von Zellen, die die spezifische mRNA exprimierten, als auch die Zahl der Transkripte pro einzelner positiver Zelle lagen bei Prokollagen IV niedriger als bei Prokollagen I. In gesunder Muskulatur waren spezifische mRNA-Transkripte in geringer Menge nachweisbar. Im SMA-Muskel war die Zahl der mRNA-Transkripte von Prokollagen IV gegenüber den Normalkontrollen signifikant erhöht (Abbildung 4.21)

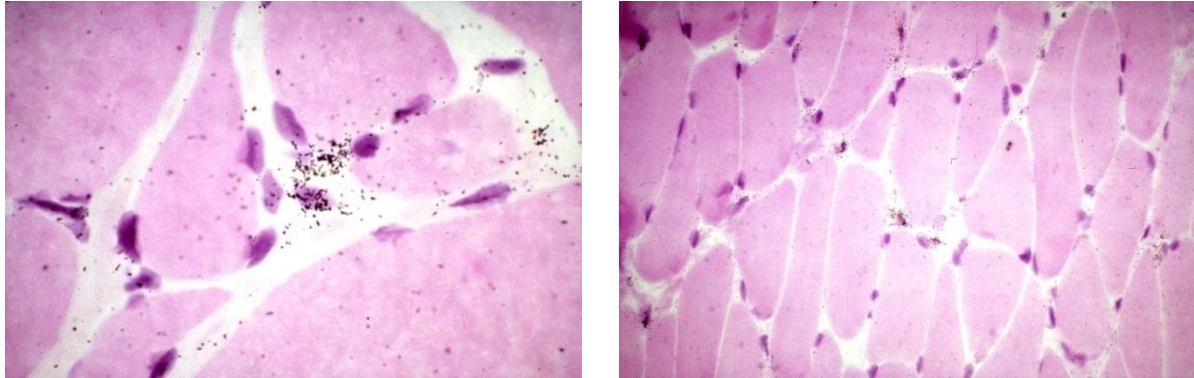


Abbildung 4.20

*In situ*-Hybridisierung mit <sup>35</sup>S-markierter Antisense-RNA Sonde für Prokollagen IV.

- a DMD-Muskel, Expression mit der Antisense-Sonde über Kernen nicht-myogener Zellen, x 1000.
- b Normalkontrolle, geringfügige Expression von Prokollagen IV mRNA über Kernen nicht-myogener Zellen, x 200.

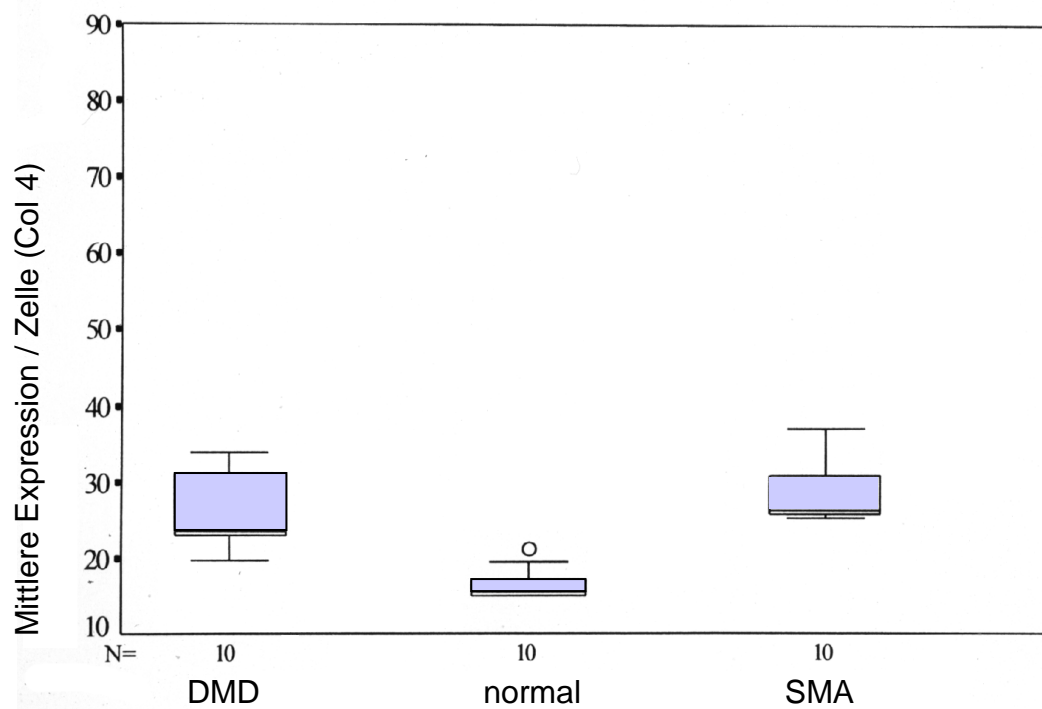


Abbildung 4.21

Semiquantitative Analyse der mRNA-Transkripte von Prokollagen IV im DMD-Muskel, im SMA-Muskel und im Muskel von Normalkontrollen. Die mRNA-Transkripte von Prokollagen IV sind im DMD-Muskel und im SMA-Muskel gegenüber Normalkontrollen signifikant vermehrt ( $p < 0,005$ ).

#### 4.4.3 MMP-1

Im DMD-Muskel waren die mRNA-Transkripte von *MMP-1* bevorzugt diffus über den Schnitt verteilt, die Zahl der mRNA-Transkripte pro Zelle war meist niedrig (Abbildung 4.22), es waren einzelne fokale Anhäufungen von mRNA-Transkripten vorhanden. Bei dieser ISH war eine verstärkte Hintergrundaktivität nachweisbar, die die Auswertbarkeit und damit die semiquantitative Analyse der mRNA-Transkripte beeinträchtigt. Für die Quantifizierung der mRNA ist dann die quantitative PCR entscheidend. Bei den Normalkontrollen waren ebenfalls spezifische mRNA-Transkripte über mehreren Zellen nachweisbar.

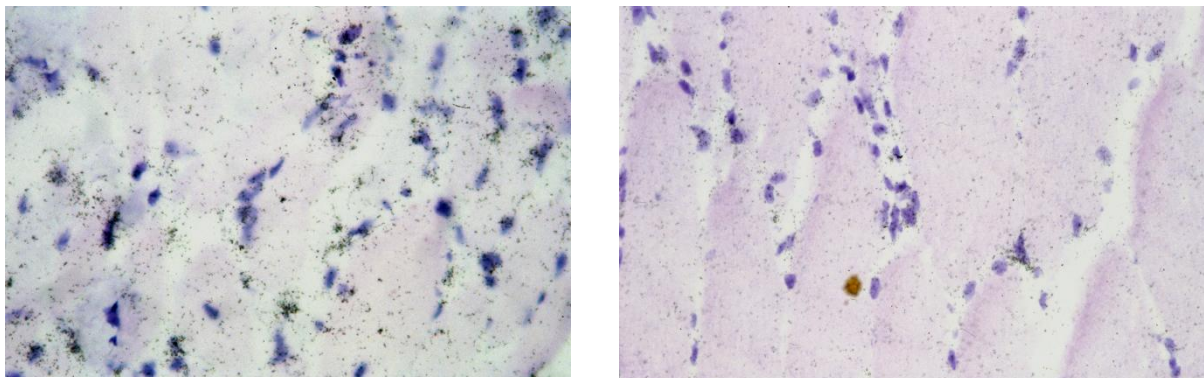


Abbildung 4.22 *In situ*-Hybridisierung mit <sup>35</sup>S-markierter Antisense-RNA Sonde für MMP-1.

- a DMD-Muskel, mRNA-Transkripte über viele Zellen verteilt ohne stark erhöhtes Expressionsniveau einzelner Zellen; die Hintergrundaktivität ist erhöht, so dass die Auswertbarkeit eingeschränkt ist, x 400.
- b Normalkontrolle, spezifische mRNA-Transkripte sind über mehreren Zellkernen dargestellt, x 400.

Die semiquantitative Analyse der mRNA-Transkripte von MMP-1 ergab einen signifikanten Unterschied zwischen DMD-Patienten und Normalkontrollen ( $p < 0,001$ ).

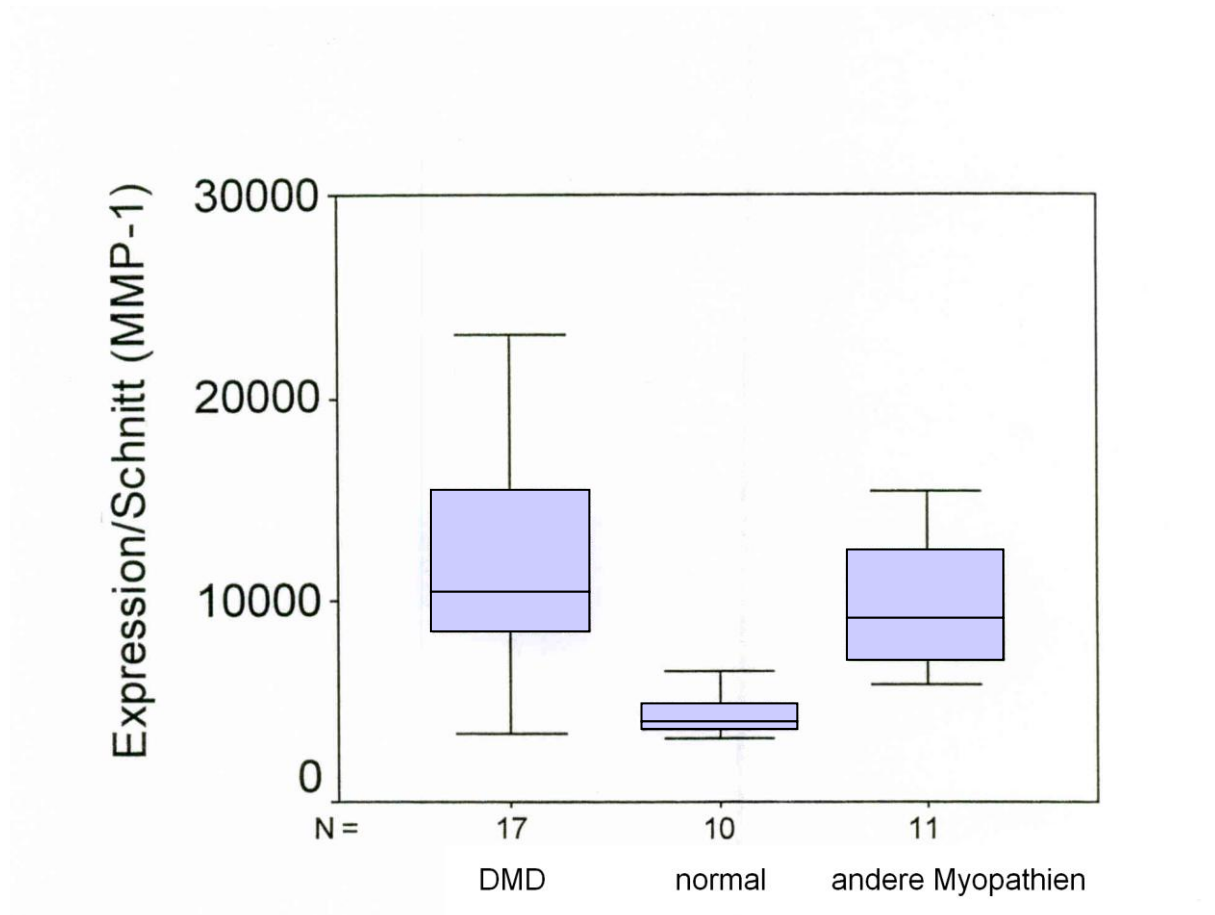


Abbildung 4.23

Semiquantitative Analyse der mRNA-Transkripte von MMP-1 im DMD-Muskel, anderen Myopathien und bei Normalkontrollen; die mRNA-Transkripte von MMP-1 waren signifikant vermehrt ( $p < 0,001$ ).

#### 4.4.4 MMP-2

Die Zahl der MMP-2 mRNA-Transkripte waren im DMD-Muskel stark vermehrt (Abbildung 4.24). Es waren sowohl der prozentuale Anteil der mRNA positiven Zellen als auch die Expression spezifischer mRNA pro positiver Zelle deutlich gesteigert. In allen Abschnitten der Gewebeproben wurden vermehrt mRNA-Transkripte nachgewiesen, die Expression erfolgte überwiegend in Vimentin positiven endomyseal gelegenen Zellen.

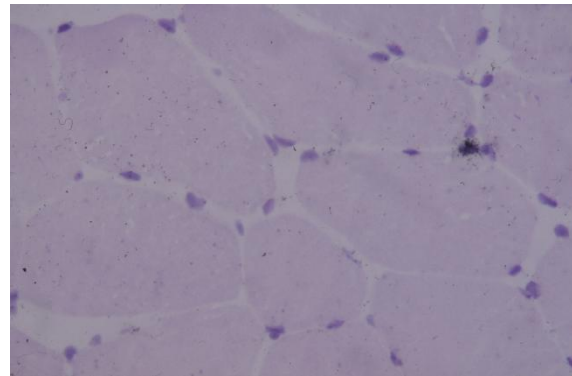
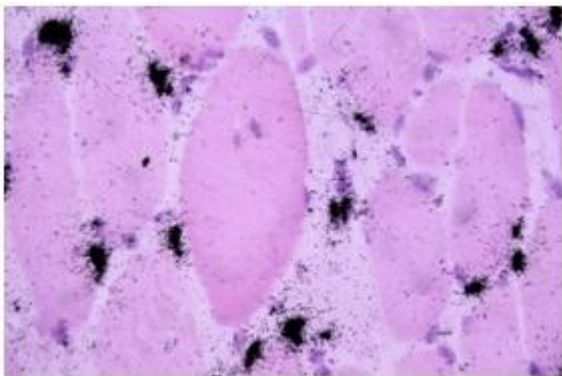


Abbildung 4.24 *In situ*-Hybridisierung mit  $^{35}\text{S}$ -markierter RNA Sonde für MMP-2.

a DMD-Muskel, mit der Antisense-Sonde werden mRNA-Transkripte über vielen nicht-myogenen Zellen dargestellt, z. T. stark erhöhte Anzahl von Transkripten, x 400.

b Normalkontrolle; Nachweis spezifischer mRNA-Transkripte über einem Zellkern in der ECM, x 400.

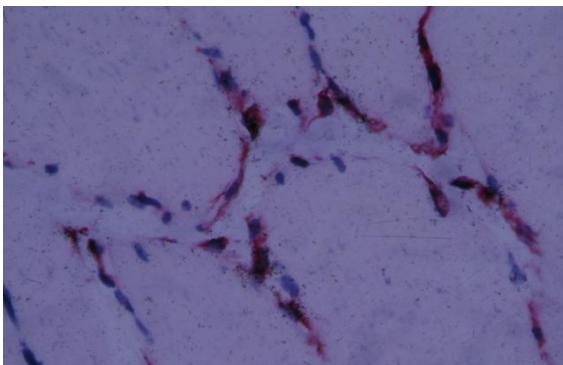


Abbildung 4.25

Doppelmarkierung IH/ISH mit Antikörpern gegen Vimentin und MMP-2-Antisense-Sonde. Die spezifischen mRNA-Transkripte sind in Vimentin positiven Zellen dargestellt, x 1000.

Für MMP-2 wurde ein hochsignifikanter Unterschied zwischen DMD-Patienten und Normalkontrollen ermittelt ( $p < 0,0001$ ). Sowohl der relative Anteil der mRNA positiven Zellen als auch die mRNA-Expression pro Zelle waren erhöht. Damit war die mRNA-Expression pro Schnitt deutlich gesteigert (Abbildung 4.26).

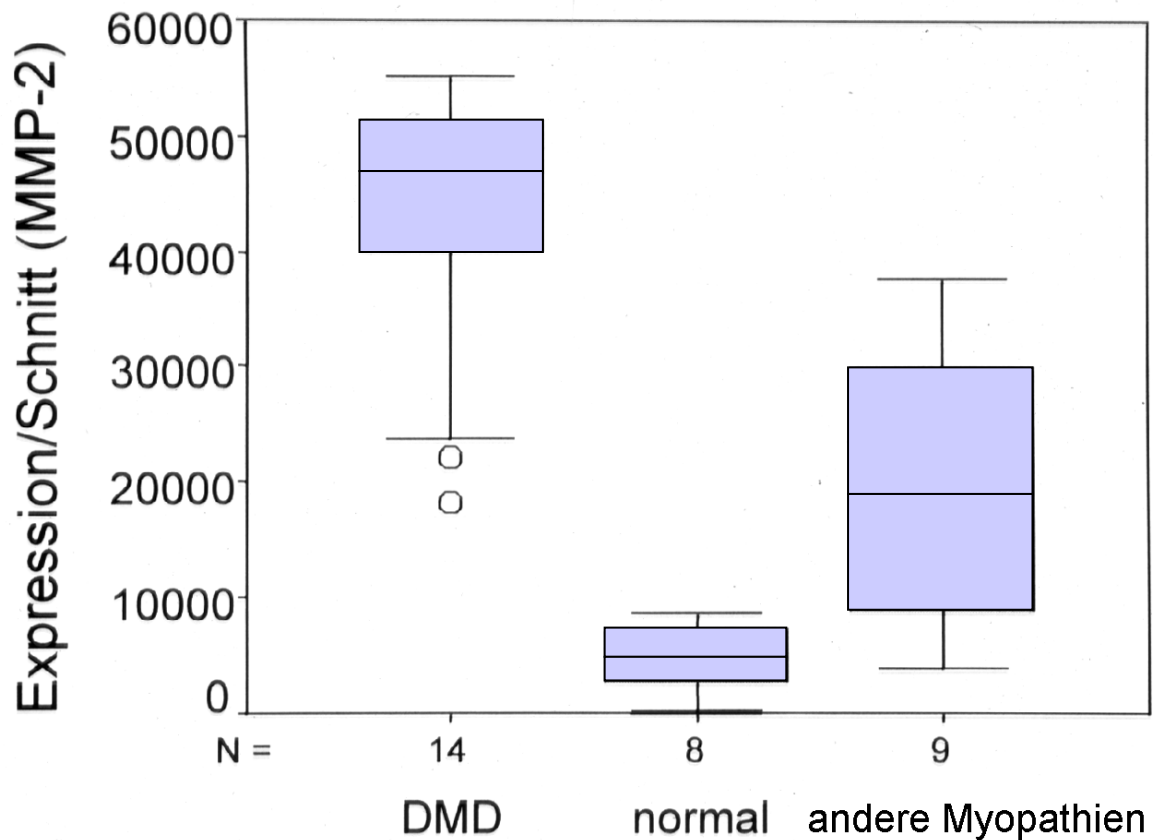


Abbildung 4.26

Semiquantitative Analyse der mRNA-Transkripte von MMP-2, DMD-Muskel, anderen Myopathien und bei Normalkontrollen; die mRNA-Transkripte von MMP-2 waren bei der DMD signifikant erhöht, sowohl gegenüber den Normalkontrollen ( $p < 0,0001$ ) als auch gegenüber den anderen Myopathien.



#### 4.4.5 TIMP-1

Die Zahl der spezifischen mRNA-Transkripte von TIMP-1 war deutlich vermehrt. Die Transkripte traten fokal betont in Bereichen des Muskels auf, in denen Fasernekrosen und regenerierende Muskelfasern nachweisbar waren (Abbildung 4.27). mRNA-Transkripte von TIMP-1 wurden fast ausschließlich in Vimentin-positiven Zellen in der ECM nachgewiesen.

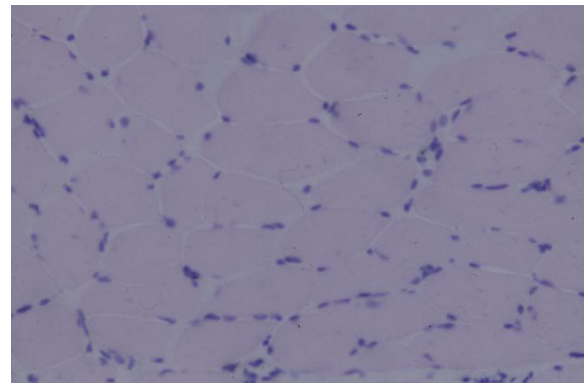
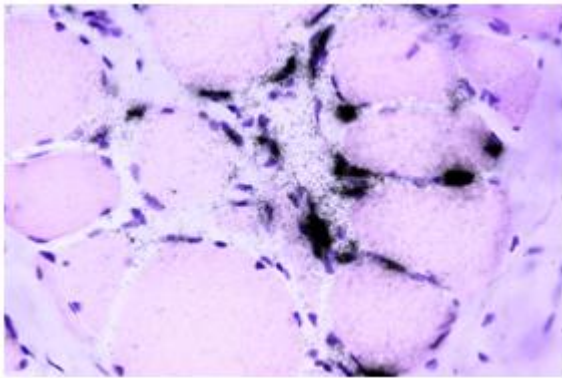


Abbildung 4.27 *In situ*-Hybridisierung mit <sup>35</sup>S-markierter RNA Sonde für TIMP-1.

a DMD-Muskel, mit der Antisense-Sonde wird eine fokal deutlich gesteigerte Anzahl von mRNA-Transkripten nachgewiesen, x 400.

b Normalkontrolle, Antisense-Sonde, es werden wenige unspezifische Signale dargestellt, x 200.

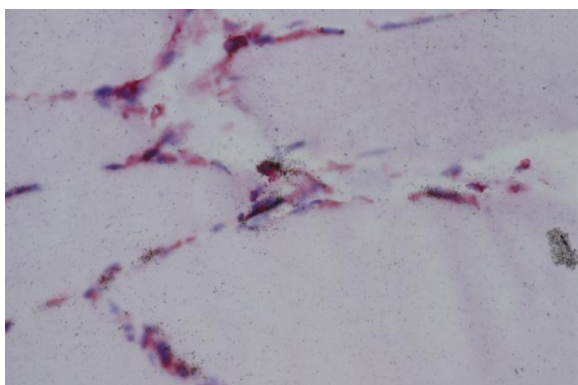


Abbildung 4.28

DMD-Muskel, Doppelmarkierung IH/ISH mit Antikörpern gegen Vimentin und TIMP-1-Antisense-Sonde. Die spezifischen mRNA-Transkripte werden in den Vimentin positiven Zellen exprimiert, x 1000.

Die semiquantitative Analyse der mRNA-Expression von TIMP-1 ergab einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den DMD-Muskeln und solchen von Kontrollprobanden ( $p < 0,0001$ ). Dabei war bei einem etwa gleich hohen Anteil mRNA positiver Zellen die stark gesteigerte Anzahl von mRNA-Transkripten pro Zelle ausschlaggebend (Abbildung 4.29). Im Vergleich zwischen den „anderen Myopathien“ und den Normalkontrollen war der Unterschied ebenfalls signifikant.

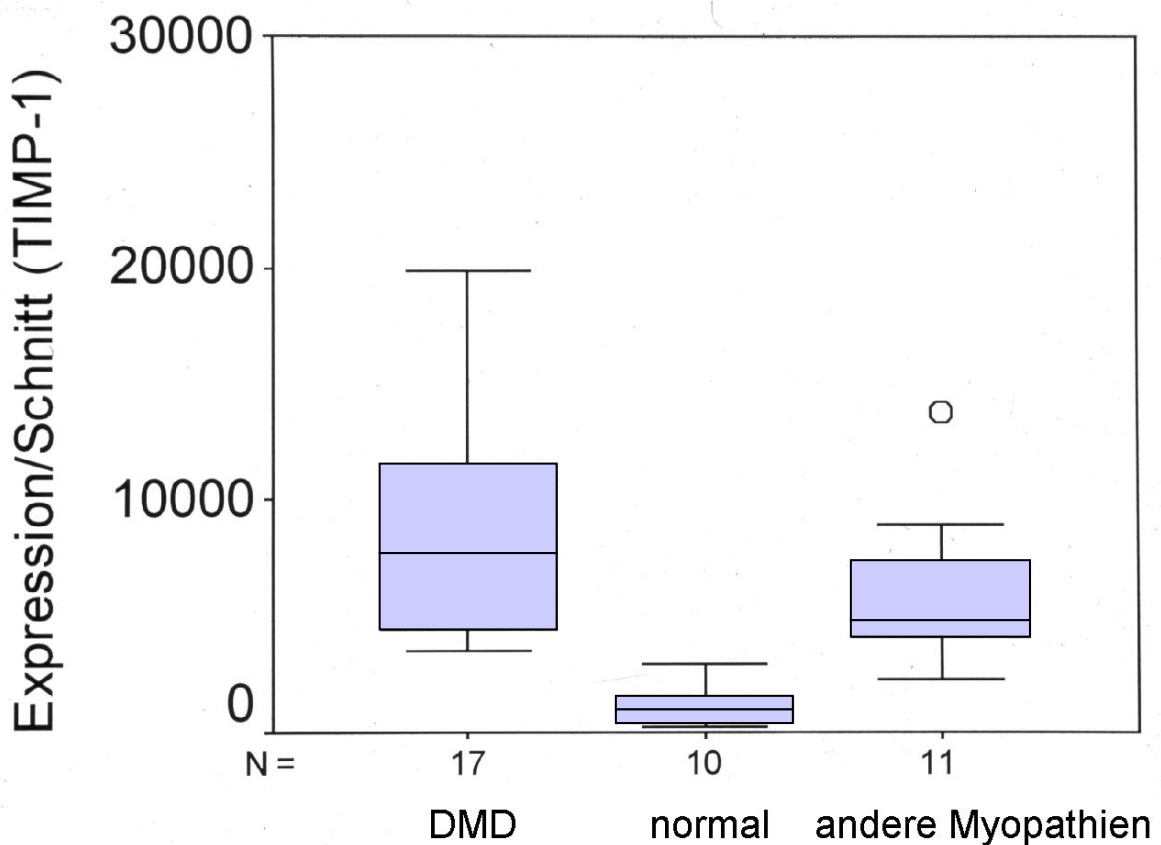


Abbildung 4.29

Semiquantitative Analyse der mRNA-Transkripte von TIMP-1 im DMD-Muskel und bei Normalkontrollen; die mRNA-Transkripte von TIMP-1 ( $p < 0,0001$ ) waren bei der DMD signifikant erhöht.

#### 4.4.6 TIMP-2

Die Menge an TIMP-2 mRNA-Transkripten war im DMD-Muskel signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ), es fielen fokale Häufungen von mRNA-Transkripten in Bereichen zellulärer Infiltrate auf (Abbildung 4.30). Im gesunden Muskel konnte homogen über den Schnitt verteilt eine geringe Zahl von TIMP-2 mRNA-Transkripten nachgewiesen werden.

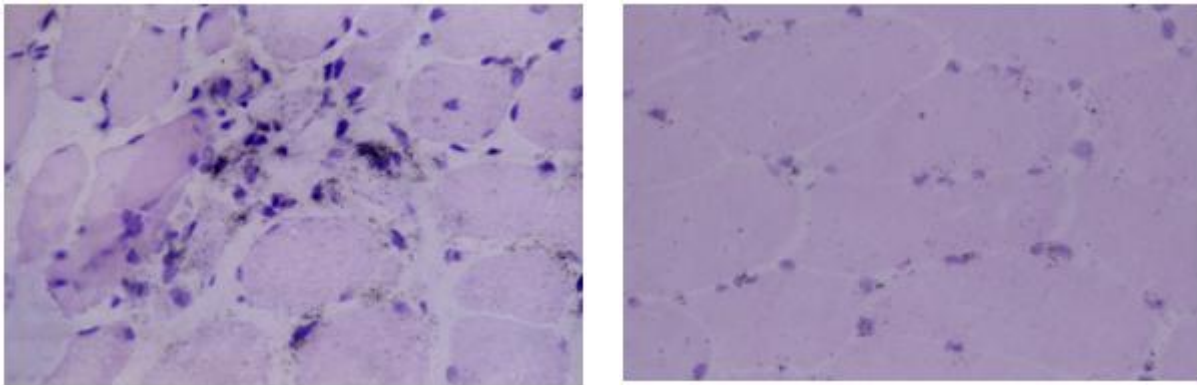


Abbildung 4.30 *In situ*-Hybridisierung mit <sup>35</sup>S-markierter Antisense-Sonde für *TIMP-2*.

a DMD-Muskel, fokale Vermehrung spezifischer mRNA-Transkripte in nicht-myogenen Zellen, x 200.

b Normalkontrolle, Nachweis von mRNA-Transkripten über Kernen nicht-myogener Zellen, x 200.

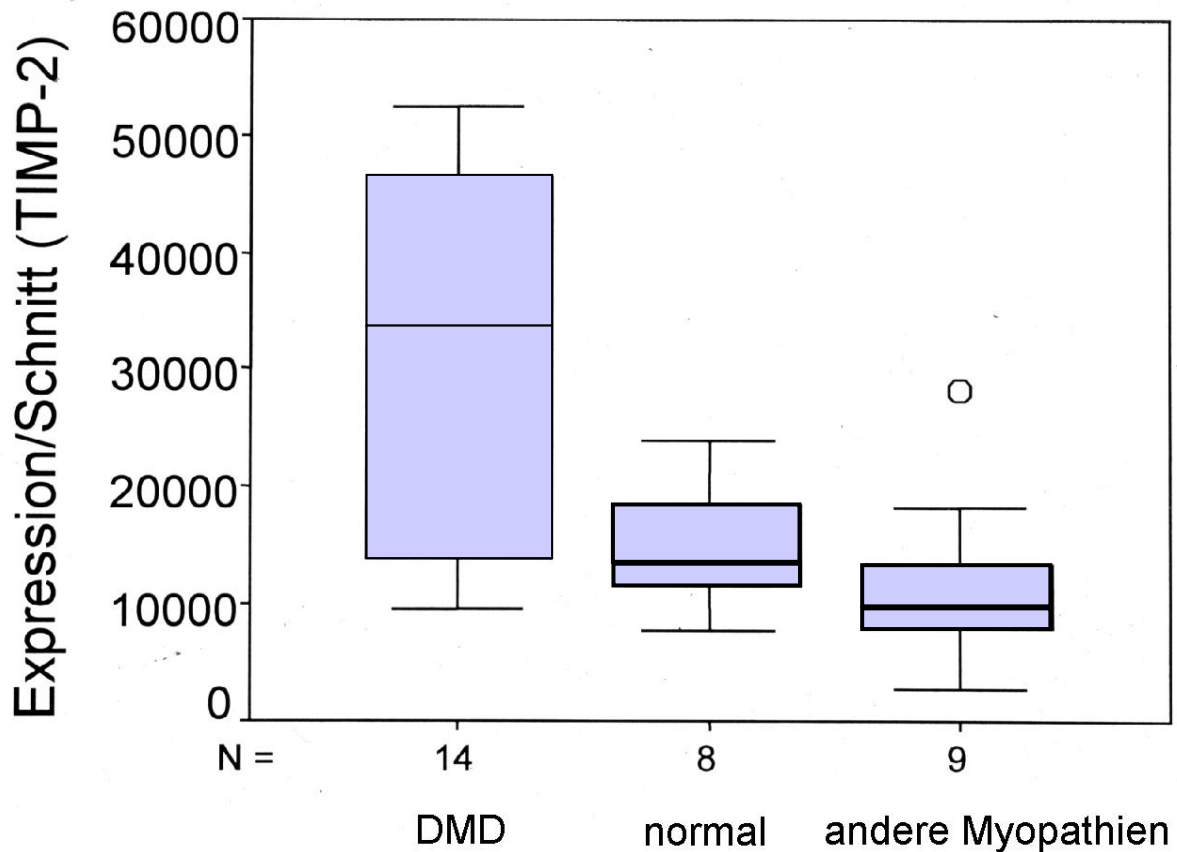


Abbildung 4.31

Semiquantitative Analyse der mRNA-Transkripte von TIMP-2 im DMD-Muskel, bei anderen Myopathien und bei Normalkontrollen; die Zahl der mRNA-Transkripte von TIMP-2 war signifikant erhöht, bei den „anderen Myopathien“ war die Expression nicht gesteigert.

Der relative Anteil mRNA positiver, nicht-myogener Zellen zwischen DMD-Muskeln und Normalkontrollen war nicht signifikant unterschiedlich. Die mRNA Expression pro Zelle war jedoch gesteigert, so dass die Expression pro Schnitt signifikant erhöht war (Abbildung 4.31).

MMP-2 und TIMP-2 können einen Komplex bilden, den „Large Inhibitor of Metalloproteinase“ (LIMP), der eine TIMP-1 synergistische hemmende Wirkung auf

MMP-1 hat [184]. Es wurde daher in Serienschnitten die Ko-Expression von mRNA-Transkripten von *MMP-2* und *TIMP-2* in einer Zelle untersucht. Dabei konnten Zellen dargestellt werden, die sowohl Transkripte von *MMP-2* als auch von *TIMP-2* aufwiesen (Abbildung 4.32).

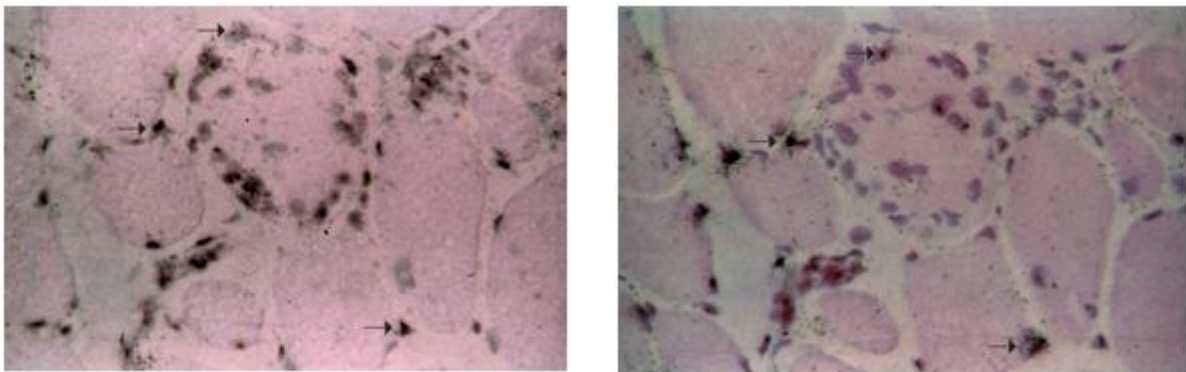


Abbildung 4.32 Serienschnitt DMD-Muskel, *In situ*-Hybridisierung mit <sup>35</sup>S-markierter Antisense-Sonde für

a MMP-2 mRNA.

b TIMP- 2 mRNA.

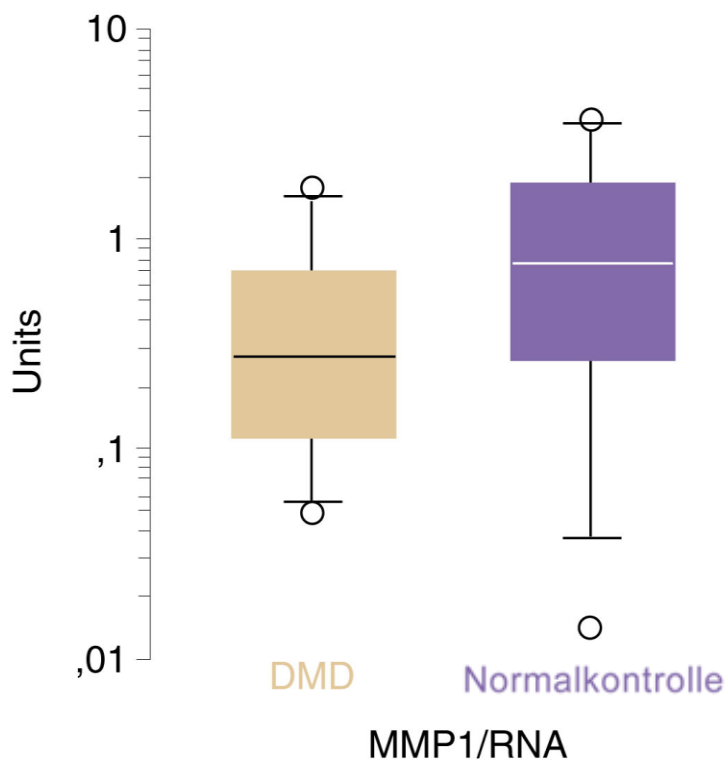
Es können einzelne Zellen identifiziert werden (schwarze Pfeile), die sowohl MMP-2 mRNA-Transkripte als auch TIMP-2 mRNA-Transkripte exprimieren, x 400.

#### 4.5 Quantitative mRNA-Bestimmung

Eine quantitative mRNA-Bestimmung erfolgte von MMP1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 sowie als Positivkontrolle von TGF- $\beta$ 1 [26]. Als interner Standard zur Quantifizierung wurde zunächst HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) gewählt. Aufgrund der unterschiedlichen Menge der mRNA-Transkripte von HPRT in den Muskelproben von DMD-Patienten und Kontrollprobanden erwies sich HPRT jedoch als ungeeignet. Es wurde deshalb die Gesamt-RNA als Bezugsgröße gewählt [26].

#### 4.5.1 MMP-1

Die quantitative mRNA-Bestimmung von MMP-1 ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen dem DMD-Muskel und den Kontrollen. Die absolute Menge von mRNA-Transkripten war für MMP-1 niedriger als für die anderen untersuchten Gene (Abbildung 4.33).



**Abbildung 4.33** Quantitative Bestimmung der mRNA-Transkripte von MMP-1 im DMD-Muskel. Die spezifische mRNA wurde zur Quantifizierung auf die Gesamt-RNA bezogen. Es wurde kein signifikanter Unterschied der mRNA-Expression nachgewiesen.

#### 4.5.2 MMP-2

Die MMP-2 mRNA-Transkripte waren im DMD-Muskel signifikant vermehrt ( $p < 0,005$ ; Abbildung 4.34).

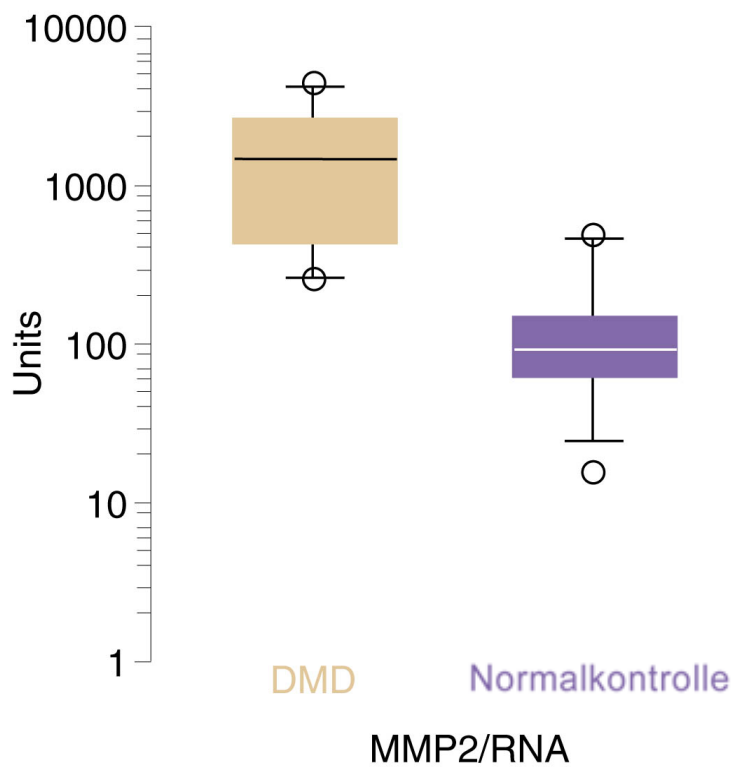


Abbildung 4.34 Quantitative Bestimmung der mRNA-Transkripte von MMP-2 im DMD-Muskel.

Die spezifische mRNA wurde zur Quantifizierung auf die Gesamt-RNA bezogen. Es wurden signifikant vermehrte mRNA-Transkripte für MMP-2 im DMD-Muskel nachgewiesen.

### 4.5.3 TIMP-1

Die quantitative mRNA-Analyse ergab eine signifikante Erhöhung der TIMP-1 mRNA-Transkripte ( $p < 0,001$ ) im DMD-Muskel (Abbildung 4.35).

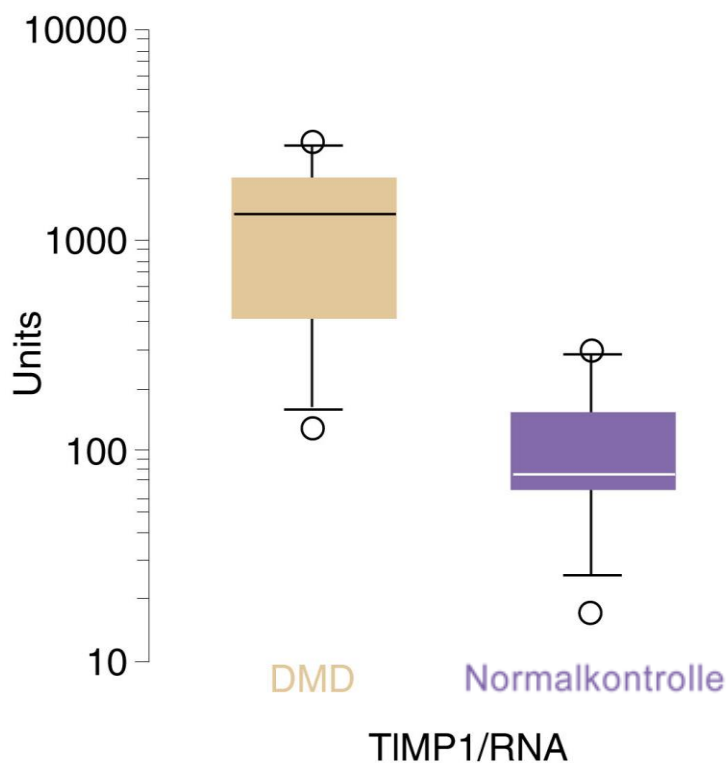


Abbildung 4.35 Quantitative Bestimmung der mRNA-Transkripte von TIMP-1 im DMD-Muskel.

Die spezifische mRNA wurde zur Quantifizierung auf die Gesamt-RNA bezogen. Es wurden signifikant vermehrte mRNA-Transkripte für TIMP-1 im DMD-Muskel nachgewiesen.



#### 4.5.4 TIMP-2

Die quantitative mRNA-Analyse ergab eine signifikante Erhöhung der TIMP-2 mRNA-Transkripte ( $p < 0,005$ ) im DMD-Muskel (Abbildung 4.36).

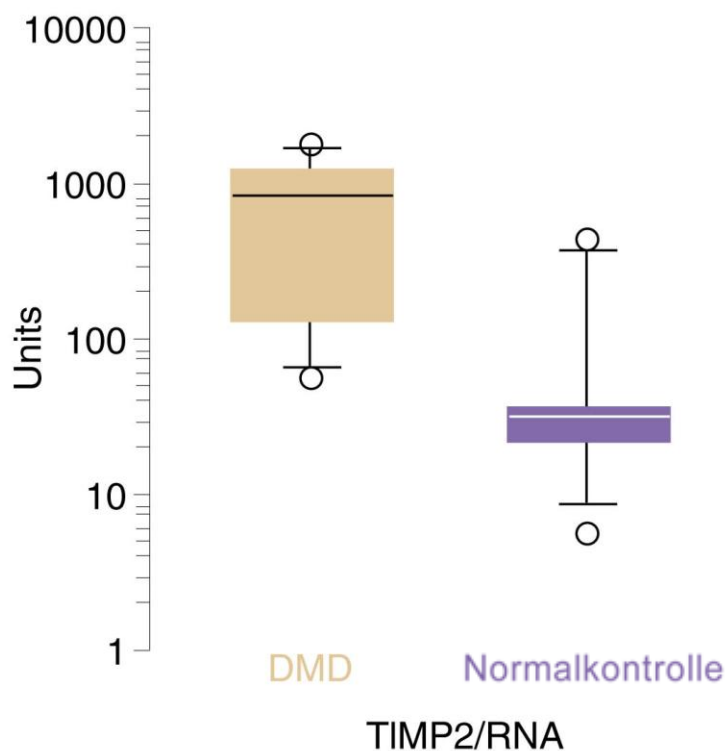


Abbildung 4.36 Quantitative Bestimmung der mRNA-Transkripte von TIMP-2 im DMD-Muskel.

Die spezifische mRNA wurde zur Quantifizierung auf die Gesamt-RNA bezogen. Es wurden signifikant vermehrte mRNA-Transkripte für TIMP-2 im DMD-Muskel nachgewiesen.

#### 4.5.5 TGF- $\beta$ 1

Als Positivkontrolle wurde *TGF- $\beta$ 1* untersucht, in Übereinstimmung mit Bernasconi et al. [26] die Anzahl der mRNA-Transkripte im DMD-Muskel signifikant erhöht ( $p < 0,005$ ) (Abbildung 4.37).

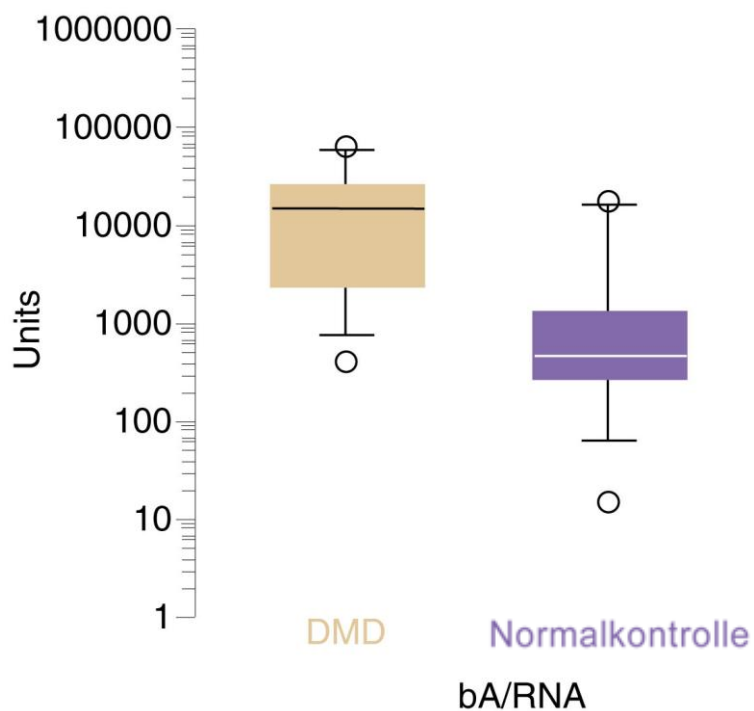


Abbildung 4.37 Quantitative Bestimmung der mRNA-Transkripte von *TGF- $\beta$ 1* im DMD-Muskel.

Die spezifische mRNA wurde zur Quantifizierung auf die Gesamt-RNA bezogen. Es wurden signifikant vermehrte mRNA-Transkripte für TGF- $\beta$ 1 im DMD-Muskel nachgewiesen.

#### 4.5.6 HPRT

Bemerkenswerterweise war auch die Menge der mRNA-Transkripte von *HPRT* im DMD-Muskel signifikant vermehrt ( $p < 0,005$ ) (Abbildung 4.38). Diese Werte konnten daher nicht als Referenzgröße für die Quantifizierung herangezogen werden.

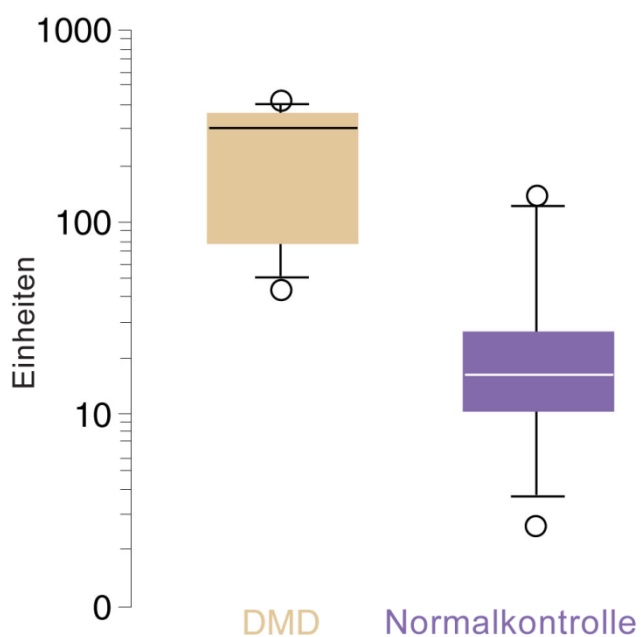


Abbildung 4.38 Quantitative Bestimmung der mRNA-Transkripte von *HPRT* im DMD-Muskel.

Die spezifische mRNA wurde zur Quantifizierung auf die Gesamt-RNA bezogen. Es wurden signifikant vermehrte mRNA-Transkripte für *HPRT* im DMD-Muskel nachgewiesen.

#### 4.5.7 MMP-1/TIMP-1

Der Quotient MMP-1/TIMP-1 ist für den DMD-Muskel deutlich zum TIMP-1 hin verschoben. Diese Konstellation ist in Übereinstimmung mit einer Hemmung des Abbaus fibrillärer Kollagene (Abbildung 4.39).

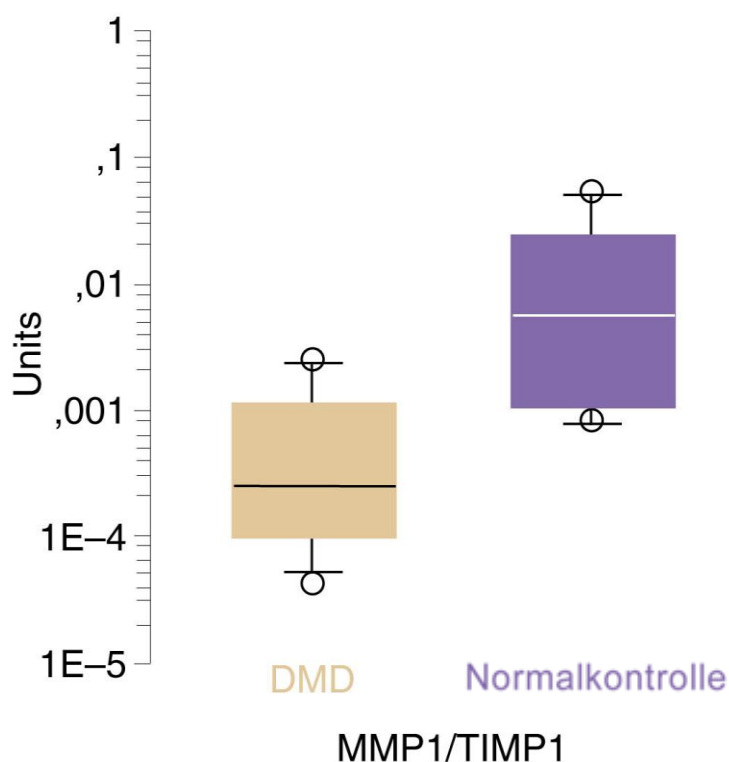


Abbildung 4.39 Quotient der mRNA-Transkripte von MMP-1 und TIMP-1 im DMD-Muskel.

Die spezifische mRNA wurde zur Quantifizierung auf die Gesamt-RNA bezogen. Es wurden signifikant vermehrte mRNA-Transkripte für MMP-1/TIMP-1 im DMD-Muskel nachgewiesen.

## 4.6 Serologische Untersuchungen

Es wurden die Serumwerte von Kollagen I, III und VI und von Laminin P1, Tenascin und TIMP-1 bei DMD-Patienten und gesunden Probanden (Normalkontrollen) gemessen (Tabelle 2.4). Die Serumwerte von Kollagen VI und von TIMP-1 wurden auch bei einer Gruppe von DMD-Patienten untersucht, die eine Steroidtherapie erhielten (Tabelle 2.5)

### 4.6.1 Serumwerte von Kollagen I und Kollagen III

Die Serumwerte der fibrillären Kollagene I (PICP) und Kollagen III (PIIINP) waren bei DMD-Patienten bis auf eine Ausnahme nicht erhöht. Untersucht wurde die Gruppe ohne Steroidtherapie. Nur bei einem siebenjährigen Jungen lag der PICP-Wert oberhalb des Normalbereichs.

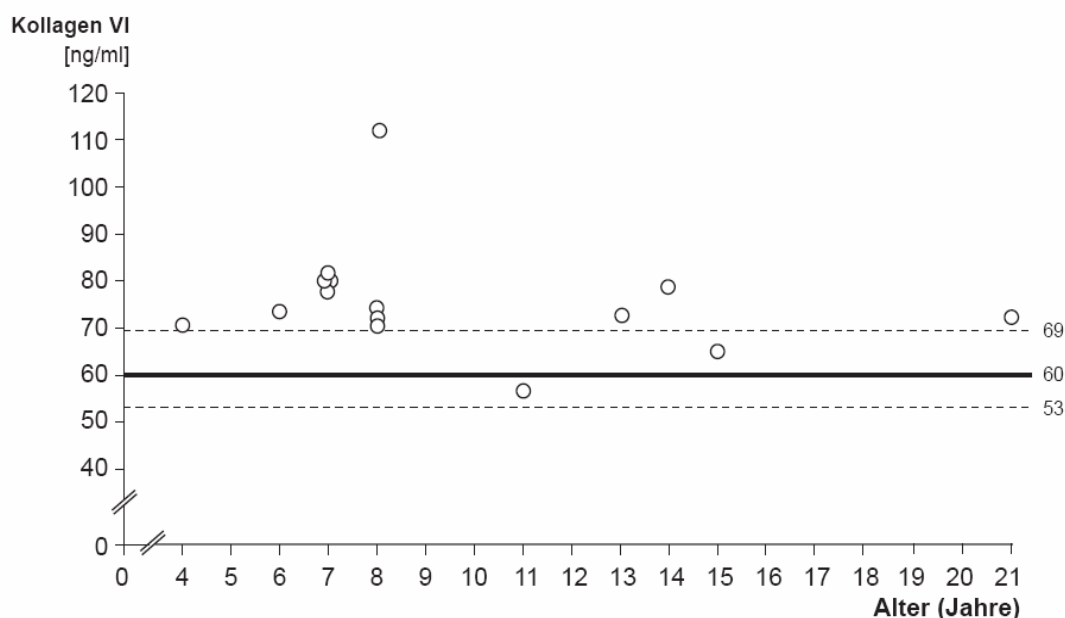
### 4.6.2 Serumwerte von Kollagen VI

Der Median der Serumwerte von Kollagen VI war bei DMD-Patienten ohne Steroidtherapie im Vergleich mit dem Wert der Normalkontrollen signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ). Innerhalb dieser Patientengruppe korrelierten die Kollagen VI-Werte weder mit dem Lebens- oder Manifestationsalter (Abbildung 4.40) und dem Krankheitsstadium der Patienten noch mit CK-Aktivitäten im Serum der Patienten oder deren Mutationen im *DMD*-Gen. Dies galt entsprechend auch für die DMD-Patientengruppe unter Steroidtherapie. Der mit Abstand höchste Wert wurde bei einem achtjährigen Jungen mit dem charakteristischen Phänotyp einer DMD gemessen.

Es bestanden eine Pseudohypertrophie der Waden, leichte Kontrakturen an den unteren Extremitäten, eine deutliche, proximal betonte Muskelschwäche mit positivem Gowers-Zeichen, Treppensteigen und Rennen waren nicht mehr möglich. Der CK-Wert war auf  $> 6000$  U/l erhöht, in der Immunhistologie des Muskels war nahezu kein Dystrophin nachweisbar, es wurde eine "out-of-frame" Deletion Ex 7-39 im *DMD*-Gen nachgewiesen.

Die anderen Patienten dieses Alters hatten Kollagen VI-Werte, die denen der DMD-Patienten anderer Altersgruppen entsprachen.

Bei zwei Patienten lag der Serumspiegel im oberen Normbereich. Einer dieser Patienten fiel durch eine bereits im Vorschulalter deutlich ausgeprägte Kontraktur neigung auf.



**Abbildung 4.40** Serumspiegel von Kollagen VI; DMD-Patienten ohne Steroidbehandlung; n=13; --- : Normalbereich. Der Median ist gegenüber dem Normalbereich signifikant erhöht ( $p < 0.01$ ).

Bei den DMD-Patienten unter einer Steroidbehandlung lagen die Serumspiegel von Kollagen Typ VI ganz überwiegend im normalen Bereich (Abbildung 4.41). Bei 2 Patienten wurden leicht erhöhte Werte gemessen. Diese Patienten unterschieden sich weder in bezug auf ihre Ansprechbarkeit auf die Steroidbehandlung noch durch Besonderheiten des Phänotyps von den anderen Patienten der Therapiegruppe. Der Zeitpunkt der Bestimmung des Serumwertes lag 6-61 Monate nach Beginn der Steroidbehandlung.

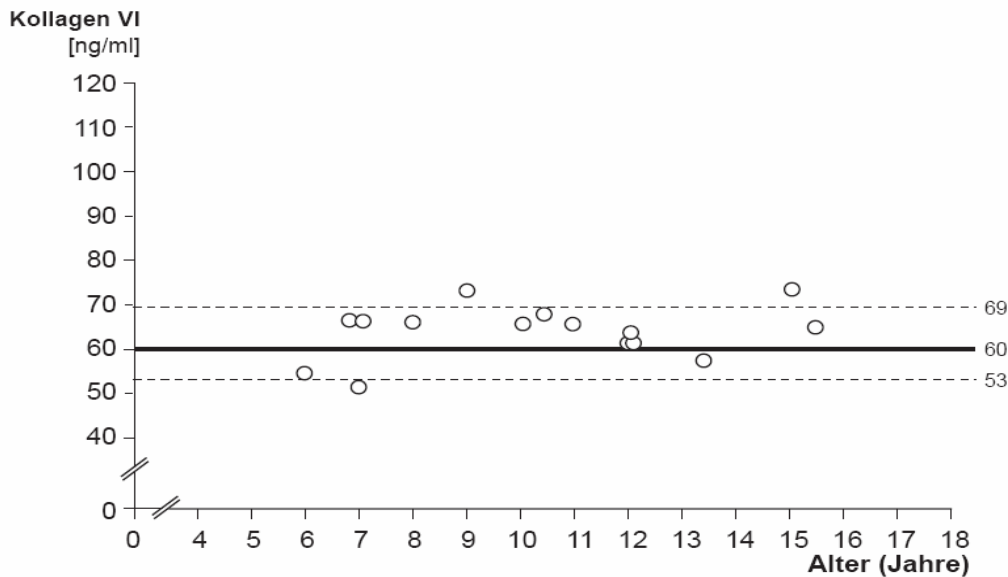


Abbildung 4.41 Serumspiegel von Kollagen VI; DMD-Patienten mit Steroidbehandlung; n=15; - - : Normalbereich. Die Werte liegen überwiegend im Normalbereich, nur bei zwei Patienten liegen die Werte leicht über dem Normalbereich; Normalwerte nach Gerling et al. [115].

#### 4.6.3 Serumwerte von Laminin P1

Die Serumspiegel des basalmembranständigen Laminins P1 waren bei allen DMD-Patienten nicht erhöht.

#### 4.6.4 Serumwerte von Tenaszin

Die Serumwerte des Tenaszins lagen bis auf eine Ausnahme bei den DMD-Patienten im Normbereich. Bei einem vierjährigen DMD-Patienten wurde ein erhöhter Serumwert von 818 ng/ml ( $N < 700$  ng/ml) gemessen. Bei dem ebenfalls betroffenen dreijährigen Bruder dieses Patienten lag der Wert mit 593 ng/ml im Normbereich.

#### 4.6.5 Serumwerte von TIMP-1

Der Median der Serumwerte von TIMP-1 war bei DMD-Patienten nicht signifikant erhöht. Bei 4 von 14 DMD-Patienten ohne eine Steroidbehandlung und 1 von 15 DMD-Patienten mit einer Steroidbehandlung lagen die Werte leicht oberhalb des Normalbereichs. Erhöhte Werte wurde nur bei den DMD-Patienten gemessen, die jünger als 9 Jahre waren. Bei dem vierjährigen Patienten mit dem erhöhten Tenaszinwert war auch der TIMP-1-Wert im Serum erhöht. Die anderen Patienten mit einem erhöhtem für TIMP-1-Wert hatten normale Tenaszinwerte im Serum.



---

## 5 Diskussion

Seit den ersten Beschreibungen der Muskeldystrophie Duchenne ist die exzessive Akkumulation von ECM ein wesentliches pathologisches Merkmal der Erkrankung (*'Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique, ou paralysie myo-sclérosique'*). Für die vorliegende Arbeit wurden Untersuchungen zum Stoffwechsel der extrazellulären Matrix an Muskel- und Serumproben von Patienten mit einer DMD durchgeführt. Es wurde Gewebe von Muskelbiopsien und keine Myoblastenkulturen gewählt, um den *in vivo*-Bedingungen möglichst nahe zu kommen.

Die Gewebeproben wurden nach Abschluss der Diagnostik und Einwilligung der Eltern für die hier dargestellten Untersuchungen weiterverwendet. Allen Untersuchungen, die über die Diagnostik der Patienten hinausgingen, wurde durch die Ethikkommission der Charité Campus Virchow Klinikum zugestimmt. Es wurden keine Gewebeproben nur zu Forschungszwecken entnommen. Die Gewebemengen waren daher limitiert. Es konnten nicht alle Parameter in jeder Gewebeprobe untersucht werden, wie es wünschenswert gewesen wäre. Die signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen bei der quantitativen mRNA-Analyse und die markanten Unterschiede bei der Proteindarstellung im WB machen deutlich, dass trotz dieser Limitierungen aussagekräftige Untersuchungsergebnisse gewonnen werden konnten.

Bei der ISH wurde zur Markierung der Sonden der  $\beta$ -Strahler  $^{35}\text{S}$  verwendet. Radioaktiv markierte Sonden zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität aus. Es können auch andere Isotope zur Markierung eingesetzt werden. Diejenigen Isotope mit einer höheren Emissionsenergie wie  $^{32}\text{P}$  verursachen bei der Autoradiographie eine breitere Streuung der Signale mit geringerer Auflösung, günstig dabei ist die hohe Sensitivität und die kurze Expositionszeit. Schwache  $\beta$ -Strahler wie  $^3\text{H}$  ermöglichen zwar eine hohe Auflösung, die Sensitivität ist aber geringer und die Expositionszeit kann bis zu 12 Wochen betragen. Es wurde daher das Isotop  $^{35}\text{S}$  mit einer mittleren Emissionsenergie ausgewählt.

---

Die ISH wurde vor allem zur Lokalisation der mRNA-Transkripte eingesetzt. Die semiquantitative Analyse der mRNA-Transkripte basiert auf der Auszählung spezifischer Signale in repräsentativen Gesichtsfeldern. Der Vergleich zwischen der semiquantitativen Bestimmung mit der ISH und der quantitativen Bestimmung der mRNA-Transkripte ergab übereinstimmende Ergebnisse für MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2. Nur für MMP-1 waren die Ergebnisse diskrepant. Bei der semiquantitativen Analyse ergab sich eine signifikante Vermehrung der mRNA-Transkripte von MMP-1, dies kann durch die Auswahl der Gesichtsfelder bedingt sein oder durch die vermehrte Hintergrundaktivität, die die Auswertung beeinträchtigen kann. Die quantitative mRNA-Bestimmung ist dabei die eindeutig überlegene Methode. Die Ergebnisse dieser Untersuchung waren in Übereinstimmung mit dem Befund der WB-Untersuchung, die eine Reduzierung von MMP-1 ergab.

Als Bezugsgröße bei der quantitativen mRNA-Bestimmung wird üblicherweise ein "house keeping"-Gen wie *HPRT* verwendet. Mit *HPRT* als Bezugsgröße wurden bei dieser Untersuchung keine signifikanten Ergebnisse erzielt. In den letzten Jahren ist jedoch deutlich geworden, dass die mRNA-Expression von "house keeping"-Genen zwischen verschiedenen Geweben eines Individuums sehr variieren kann [192]. Auch die mRNA-Expression im gleichen Gewebe von verschiedenen Kontrollpersonen kann durch Aktivierung und Proliferation sehr unterschiedlich sein. Dies konnte für Bronchialgewebe bei Patienten mit Asthma bronchiale und den Kontrollpersonen gezeigt werden [117]. Auch wir haben eine signifikant unterschiedliche mRNA-Expression von *HPRT* im DMD-Muskeln im Vergleich zu Normalkontrollen nachweisen können und haben daher die spezifischen mRNA-Kopien auf die Gesamt-RNA, die in der RT-PCR Reaktion verwendet wurde, bezogen; diese Referenz wurde auch von Bernasconi et al. gewählt [26].

## 5.1 Kollagene und nicht-kollagene Glykoproteine

Die immunhistochemische Darstellung ergab eine Zunahme aller untersuchten Matrixkomponenten im DMD-Muskel, insbesondere der fibrillären Kollagene. Diese Befunde entsprachen den publizierten Daten [28,29,305,268,137,236]. Für Undulin/Kollagen XIV lagen noch keine Untersuchungen von dystropher oder myopathisch veränderter Muskulatur vor. Als Ausdruck der Synthese reifen Bindegewebes wurde eine normale Menge von Elastinfasern nachgewiesen (nicht dargestellt).

Die fibrillären Kollagene I und III waren ubiquitär in der endo- und perimysialen ECM nachweisbar. Durch die Doppelmarkierung mit IH/ISH konnte eindeutig gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von Prokollagen I in Vimentin positiven Zellen erfolgt, die anhand ihrer Struktur und der räumlichen Zuordnung als endo- und perimysial gelegene Fibroblasten identifiziert werden konnten [227]. Die gesteigerte Kollagensynthese ist daher nicht myogenen Zellen zuzuordnen, wie es aufgrund von Untersuchungen an Zellkulturen angenommen wurde [163]. Die Synthese von Kollagenen, anderen ECM-Proteinen und Adhäsionsproteinen wird durch TGF- $\beta$ 1 über die Stimulation von Fibroblasten hochreguliert [186,33].

Die Patienten <7 Jahre wiesen eine höhere Anzahl von mRNA-Transkripten von Prokollagen I auf als die Patienten >7 Jahre. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant, da in der Gruppe >7 Jahren nur drei Muskelproben untersucht werden konnten. Diese Beobachtung ist trotzdem bemerkenswert, da sie in Übereinstimmung mit den Daten von Bernasconi et al. [26] zum TGF- $\beta$ 1 im DMD-Muskel ist (s.u.). Die Abnahme der TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression in der Gruppe der Patienten ab 7 Jahren und die zeitgleich stark zunehmende Muskelfibrose sprechen dafür, dass im Verlauf der Erkrankung nicht nur die TGF- $\beta$ 1 vermittelte Stimulation der ECM Synthese für die Muskelfibrose relevant ist.

Bei der mdx-Maus ist die mRNA-Expression von Prokollagen I und Prokollagen III bei jungen Tieren gesteigert [119]. In dieser Phase ist die Fibrose der Extremitätenmuskulatur noch sehr gering ausgeprägt [253]. Während die

---

Muskelfibrose im Alter bei der mdx-Maus progredient ist [254] nimmt die mRNA-Expression von Prokollagen I und III ab [119]. Diese Konstellation spricht dafür, dass für die langsam zunehmende Fibrosierung der Muskulatur bei der mdx-Maus auch eine Störung des Kollagenabbaus relevant sein kann. Die MMP-1, die bevorzugt die fibrillären Kollagene abbaut, wurde bei der mdx-Maus bisher nicht untersucht.

Mit dem Kollagen IV-AK wurden die Basalmembranen der verschiedenen Strukturen im Muskelgewebe dargestellt. Die mRNA-Expression von Prokollagen IV wurde in endo- und perimysial gelegenen Vimentin-positiven Zellen nachgewiesen. Das Expressionsniveau lag deutlich niedriger als das der Prokollagen I-mRNA. Gegenüber Normalkontrollen war die Zahl der mRNA-Transkripte als Ausdruck eines vermehrten Zellumsatzes erhöht. Für die Zunahme des Bindegewebes im Muskel spielte Kollagen IV keine Rolle.

Im Vergleich zwischen DMD-Muskel und SMA-Muskel ergab sich kein Unterschied der mRNA-Expression. Die erhöhte Anzahl von Transkripten von Kollagen IV-mRNA bei der SMA ist in Übereinstimmung mit der verstärkten immunhistochemischen Darstellung der Basalmembranproteine.

Kollagen VI gehört zur Gruppe der nicht-fibrillären Kollagene, die Mikrofilamente und eine Quervernetzung fibrillärer Kollagene sowie separate Netzwerke bilden können [324]. Es besteht aus  $\alpha 1(VI)$ -,  $\alpha 2(VI)$ - und  $\alpha 3(VI)$ -Ketten, von denen jeweils zwei Ketten ein Dimer bilden; zwei Dimere bilden ein Tetramer. Diese Tetramere polymerisieren zu Makromolekülen aus denen die Mikrofilamente gebildet werden. Die Expression wird von TGF- $\beta 1$  stimuliert. Kollagen VI interagiert mit anderen Matrix-Komponenten wie den Proteoglykanen und ist Bindungsstelle für Wachstumsfaktoren und Zytokine wie dem PDGF [297].

Kollagen VI war im DMD-Muskel entsprechend der Verteilung der fibrillären Kollagene endo- und perimysial stark vermehrt sowie entlang der Basalmembran nachweisbar. In der Zellkultur stimuliert Kollagen VI die Proliferation mesenchymaler

---

Zellen/Fibroblasten [14]. Dieser Effekt kann dazu beitragen, den Regenerationsprozess im DMD-Muskel zugunsten der Proliferation des Bindegewebes zu verschieben ("misdirected regeneration"). Mutationen in den Genen, die die  $\alpha$ -Ketten kodieren, führen zur Bethlem Myopathie oder zur kongenitalen Muskeldystrophie Typ Ullrich [317,168]. Diese Myopathien sind durch frühzeitige Ausbildung von Kontrakturen gekennzeichnet als Ausdruck einer primären Beteiligung der ECM.

Undulin/Kollagen XIV ist ein FACIT-(fibril-associated collagens with interrupted helices)-Kollagen mit einem sehr komplexen Aufbau mit Bindungsstellen für Proteoglykane, Adhäsionsproteine und andere Kollagene [24]. Undulin/Kollagen XIV findet sich vorwiegend zwischen dichten Kollagenfibrillen in ausdifferenziertem Bindegewebe. Es wird davon ausgegangen, dass Undulin/Kollagen XIV bei der Gewebedifferenzierung und nicht bei der Proliferation eine wichtige Rolle spielt, da es in Tumorgewebe und in frühen Phasen der Embryonalentwicklung nahezu nicht vorkommt [24]. Im DMD-Muskel war Undulin/Kollagen XIV deutlich vermehrt zusammen mit den fibrillären Kollagenen im endo- und perimysialen Bindegewebe nachweisbar, die Basalmembran war ausgespart. Das Vorhandensein von Undulin/Kollagen XIV weist darauf hin, dass es sich um ausgereiftes Bindegewebe handelt. Undulin/Kollagen XIV trägt zur Vermehrung der ECM im DMD-Muskel bei. Dabei handelt es sich um eine Zunahme im Rahmen der ECM-Proliferation, der keine spezifische Bedeutung zukommt. Es lagen keine Voruntersuchungen zu Undulin/Kollagen XIV bei der DMD oder bei anderen Muskelerkrankungen vor.

Tenaszin ist eines der großen Glykoproteine der ECM, das während der Embryonalzeit in den meisten Organen exprimiert wird. Es spielt eine wichtige Rolle für die interzelluläre Kommunikation [286]. Es sind vier Gene bekannt, die Tenaszin C, Tenaszin R, Tenaszin X und Tenaszin Y kodieren [61]. Die Tenaszine werden zu unterschiedlichen Zeiten während der Organogenese und mit unterschiedlicher Verteilung in den Geweben nachgewiesen. Postnatal findet man

---

Tenaszin lediglich im zentralen und peripheren Nervensystem, im gesunden Muskel ist es nur am Sehnenansatz der Muskulatur nachweisbar. Eine Zunahme von Tenascin wurde in schnell proliferierendem Mesenchym bei der Wundheilung, bei fibrosierenden Prozessen oder bei invasiv wachsenden Karzinomen gezeigt [286]. Im DMD-Muskel trat Tenascin C (Synonyma: Cytotactin, *myotendinous antigen*, J1) in geringer Menge und fokal begrenzt im Bereich regenerierender Muskelfasern mit makrophagozytären Infiltraten auf. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Gulberg et al. [133]. Die Bildung von Tenascin wird durch die bei der DMD hochregulierten Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1, bFGF, PDGF, Interleukine IL-1 und IL-4 oder TNF- $\alpha$  induziert. Die Expression ist an die Anwesenheit von Makrophagen gebunden, so dass diese als wichtigste Induktoren angesehen werden. Daher ist die Expression von Tenascin im Makrophagen-reichen Myositis-Muskel wesentlich stärker ausgeprägt als bei der DMD [133].

Die strukturelle und funktionelle Vielfalt von Fibronectin entsteht durch alternatives Splicen. Dieses Mosaikprotein verfügt über Interaktionssequenzen für verschiedene ECM-Komponenten wie Integrine, Proteoglykane, Kollagene und Fibrinogen [286]. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Organisation der ECM und ist damit an der Regulation von Proliferation und Differenzierung von Geweben beteiligt. Fibronectin ist bei der Myogenese in die Steuerung der Migration von Muskelvorläuferzellen in die Extremitätenanlage involviert [97]. Im DMD-Muskel ist Fibronectin netzförmig in der endo- und perimysial ECM stark vermehrt nachweisbar [28,137,268,97]. Die Zunahme des Fibronectins erfolgt im Rahmen der hochregulierten ECM-Synthese und nicht im Sinne einer spezifischen Aktivierung.

## 5.2 MMP-1

Die wichtigsten Substrate der Kollagenase MMP-1 sind die fibrillären Kollagene I und III. Trotz der ausgeprägten Vermehrung dieser fibrillären Kollagene im DMD-Muskel

---

wurde weder immunhistochemisch oder im WB noch bei der quantitativen mRNA-Bestimmung eine vermehrte Expression von MMP-1 nachgewiesen. Im WB erschien die MMP-1-Bande im DMD-Muskel schwächer ausgeprägt als bei den Normalkontrollen.

Die Aktivierung der MMP-1 kann durch bFGF, EGF oder TNF- $\alpha$  erfolgen und über eine proteolytische Aktivierung durch andere MMPs. MMP-1 wird transcriptional und posttranscriptional durch TGF- $\beta$ 1 herunterreguliert [94,248]. Die Hemmung durch TIMP-1 erfolgt in stoichiometrischer Bindung im Verhältnis 1:1 [121], auch die anderen TIMPs können MMP-1 inhibieren [336]. Im DMD-Muskel waren mRNA-Expression von TIMP-1 und das TIMP-1-Protein hochreguliert [230]. Dies war bereits für TGF- $\beta$ 1 gezeigt worden [26,339]. Beide Faktoren können die Herunterregulierung von MMP-1 im DMD-Muskel erklären. MMP-1 kann auch durch den LIMP (large inhibitor of metallo proteinases) blockiert werden [184]. LIMP ist ein Komplex aus MMP-2 und TIMP-2. In Serienschnitten wurde die Koexpression von MMP-2 mRNA und TIMP-2 mRNA gezeigt, d.h. dass auch dieser Mechanismus hier eine Rolle spielen kann.

Das Missverhältnis zwischen der gesteigerten ECM-Synthese mit einem hohen Anteil fibrillärer Kollagene und der Hemmung von MMP-1 ist ein wesentlicher Faktor für die zunehmende Fibrose des Muskels.

In den wenigen Arbeiten zu MMPs bei Muskelerkrankungen hat MMP-1 kaum Beachtung gefunden. Kieseier et al. [176] haben die Expression von MMPs und TIMPs bei entzündlichen Myopathien untersucht. Als Kontrollen standen ein DMD-Patient und vier BMD-Patienten, zwei LGMD-Patienten und ein Patient mit einer Miyoshi-Myopathie zur Verfügung. Diese Untersuchung erfolgte nicht im Vergleich zu Normalkontrollen.

Im Vergleich zwischen den beiden Patientengruppen war MMP-1 im Myositis-Muskel deutlich vermehrt nachweisbar. Dies kann erklären, warum es bei einer Myositis in der Regel nicht zu einer progredienten Muskelfibrose kommt.

Die Herunterregulation von MMP-1 und die damit verbundene Hemmung des Abbaus fibrillärer Kollagene wurde auch bei anderen Organfibrosen wie bei der Leberfibrose

---

[224,144], der kollagenösen Colitis [131], der Haemochromatose [114] oder bei der durch Bleomycin induzierten Lungenfibrose [312] beschrieben. Durch die Zugabe von MMP-1 kann eine bereits vorhandene Leberfibrose abgemildert werden [162].

### 5.3 MMP-2

Die 72 kDa-Gelatinase MMP-2 (Gelatinase A) hat ein breites Substratspektrum u.a. die Matrixkomponenten Kollagen IV, V, VII, X, XI, denaturierte fibrilläre Kollagene sowie Elastin und Laminin [213,250]. MMP-2 unterliegt einer komplexen Regulation durch TIMP-2. In Abhängigkeit von der Bindungsstelle kann entweder eine Inhibition von MMP-2 durch Bildung des MMP-2/TIMP-2 Komplexes oder eine Aktivierung durch die Bildung eines Komplexes mit MT1-MMP-2/MMP-2/TIMP-2 erfolgen [233]. Eine Aktivierung kann auch über MT-MMPs, MMP-1, MMP-7, oder Heparin erfolgen [336].

Die Funktion der MMPs geht über den Abbau von ECM-Komponenten weit hinaus. Sie sind bei der Organogenese und der postembryonalen Entwicklung und Regeneration involviert und spielen bei einer Vielzahl von Krankheitsprozessen eine wichtige Rolle [302,250]. MMP-2 ist durch den Abbau von Basalmembran ständigem Kollagen IV und Laminin sowie denaturierten fibrillären Kollagenen (Gelatine) entscheidend am sogenannten „remodeling“ von Organen beteiligt [116,302]. Durch die proteolytische Spaltung von Komponenten der Basalmembran wird die Migration von Zellen ermöglicht [116], im Muskel können Satellitenzellen aktiviert werden.

Im DMD-Muskel war MMP-2 sowohl bei der quantitativen mRNA Analyse als auch im WB und der Zymographie vermehrt nachweisbar. Mit der ISH konnte die mRNA Expression den endomyseal gelegenen Fibroblasten zugeordnet werden. Im WB und der Zymographie war die 72kDa-Bande der inaktiven proMMP-2 deutlich stärker ausgeprägt als die 62 kDa-Bande der aktiven MMP-2. Im gesunden Muskel wurde keine aktivierte MMP-2 nachgewiesen. In der Zymographie wurde auch MMP-9 (Gelatinase B) in inaktiver und aktivierter Form dargestellt.



---

Bislang lagen nur wenige Daten zu MMP-2 und MMP-9 bei der DMD vor. In den Arbeiten von Kieseier et al. [176] und Choi et al. [62] wurden Muskelbiopsien von Patienten mit einer DMD oder einer anderen Muskeldystrophie als Kontrollen zu entzündlichen Myopathien (PM, DM) untersucht. Bei Choi et al. wurden bei den entzündlichen Myopathien und der DMD MMP-2 und MMP-9 vermehrt nachgewiesen, beide MMPs wurden im Bereich regenerierender Fasern und von Endothelzellen immunhistochemisch dargestellt; MMP-9 wurde besonders in endomyseal gelegenen inflammatorischen Infiltraten nachgewiesen. Bei Kieseier et al. [176] waren MMP-9 und MMP-1 in den PM/DM-Muskeln im Vergleich zum DMD-Muskel stark vermehrt nachweisbar. Die fehlende Hochregulierung von MMP-1 im DMD-Muskel entspricht den Ergebnissen der hier vorgelegten Untersuchung. Ein Grund für den fehlenden Nachweis einer Aktivierung von MMP-2 und MMP-9 im DMD-Muskel könnte darin liegen, dass als Bezugsgröße entzündlich veränderter Muskel gewählt wurde und keine Normalkontrollen vorliegen. MMP-9 wird in entzündlichen Prozessen verstärkt exprimiert [342]. Auch innerhalb eines Dystrophindefizienten Muskels wird MMP-9 bevorzugt im Bereich entzündlicher Infiltrate nachgewiesen, weniger im Bereich regenerierender Fasern [109,175]. Ob eine vermehrte Expression von MMP-9 gegenüber Normalkontrollen bestand bleibt unklar. Die mRNA Expression von MMP-2 war im PM/DM-Muskel und im DMD-Muskel gleich stark, ein Vergleich zu Normalkontrollen ist hier ebenfalls nicht möglich.

Kherif et al. [175] konnten im Muskel der mdx-Maus ebenfalls eine Hochregulation von MMP-2 und MMP-9 nachweisen. Die Aktivierung von MMP-2 war überwiegend den regenerierenden Muskelfasern zugeordnet und die Expression von MMP-9 wurde in Bereichen zellulärer, entzündlicher Infiltrate nachgewiesen.

Fukushima et al. konnten bei dem cxmd Hund das identische Muster der Hochregulation und der Gewebeverteilung von MMP-2 und MMP-9 aufzeigen [109]. Auch bei anderen Organfibrosen des Menschen konnte eine Hochregulation von MMP-2 bzw. MMP-2 und MMP-9 nachgewiesen werden [290,96,144,131].

## 5.4 TIMP-1 und TIMP-2

Bisher wurden vier TIMPs beschrieben. Sie regulieren die potentiell gefährliche proteolytische Aktivität der MMPs. Damit kommt ihnen eine Schlüsselrolle für das Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau der ECM sowohl bei physiologischen als auch bei pathophysiologischen Prozessen zu [120,336]. Sie werden unter anderem durch TGF- $\beta$ 1 bFGF, EGF, IL-6 und IL-1 oder Retinoide aktiviert. TNF $\alpha$  wirkt in niedriger Konzentration stimulierend auf die Expression von TIMP und in hoher Konzentration hemmend. TIMPs haben über die Inhibition der MMPs hinaus weitere wichtige Funktionen. Sie sind als Wachstumsfaktor aktiv, beeinflussen die Angiogenese und stimulieren die gonadale Steroidsynthese [177,120].

Im DMD-Muskel waren TIMP-1 und TIMP-2 hochreguliert. Sun et al. [309] konnten die vermehrte Expression von TIMP-1 im DMD-Muskel und im CMD-Muskel mit IH und WB bestätigen. Das Protein wurde in endo- und perimysial gelegenen Fibroblasten, in Makrophagen und in regenerierenden Muskelfasern dargestellt. In einer Gruppe aus einem DMD-Patient, drei BMD-Patienten, 2 LGMD-Patienten und einem Patienten mit einer Myoshi-Myopathie, die als Kontrollgruppe für Myositis-Patienten diente, wurde eine vermehrte Expression von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3 gezeigt, die Expression von TIMP-1 war am stärksten hochreguliert [176]. Die kräftige Expression von TIMP-1 hemmt die Bildung und Aktivierung von MMP-1 und damit den Abbau fibrillärer Kollagene. TIMP-2 ist nicht nur bei der Entstehung der Fibrose im DMD-Muskel involviert sondern auch an der physiologischen Entwicklung der neuromuskulären Endplatte beteiligt [239,202].

Die Konstellation der Aktivierung von TIMP-1, TIMP-2 und MMP-2 ist TGF- $\beta$ 1 vermittelt und wurde bei verschiedenen Erkrankungen und experimentellen Organfibrosen nachgewiesen [144,290,131,312].

## 5.5 TGF- $\beta$ 1

TGF- $\beta$ 1 ist in vielfältiger Weise sowohl in die Organogenese als auch in pathophysiologische Vorgänge involviert. Es hat eine zentrale Bedeutung bei Erkrankungen, die mit einer Organfibrose einhergehen [33,38].

Von TGF- $\beta$  liegen drei Isoformen vor, die Gewebe spezifisch exprimiert werden [33]. TGF- $\beta$ 1 wird bevorzugt in Endothelien, hämatopoetischen Zellen und Bindegewebszellen exprimiert, TGF- $\beta$ 2 in Epithelien und neuronalen Zellen, TGF- $\beta$ 3 in mesenchymalen Zellen. TGF- $\beta$ 1 kann proteolytisch durch MMP-9 oder andere Endoproteasen aktiviert werden, es wird Plasmin vermittelt aus dem Speicherkomplex freigesetzt oder es kann durch Thrombospondin hochreguliert werden [342,63,33]. Es wird nach der Sekretion überwiegend in der ECM mit TGF- $\beta$ 1 Bindungsprotein gespeichert. TGF- $\beta$ 1 kann an verschiedene Rezeptoren binden und darüber intrazelluläre Transkriptionsfaktoren aktivieren. Decorin kann TGF- $\beta$ 1 durch Komplexbildung inhibieren [338].

Die Expression von TGF- $\beta$ 1 wurde als Positivkontrolle bei der quantitativen mRNA-Bestimmung mit untersucht. Es fiel eine signifikante Hochregulation der mRNA Expression auf, wie es bereits von Bernasconi [26] und Lundberg [205] gezeigt wurde. TGF- $\beta$ 1 war auch immunhistochemisch und im WB vermehrt nachweisbar [26,339], auch im Serum war TGF- $\beta$ 1 signifikant erhöht im Vergleich zu Normalkontrollen [165].

Die detailliertesten Angaben sind in der Arbeit von Bernasconi et al. [26] dargestellt. Die TGF- $\beta$ 1-Expression hatte in der Altersgruppe von 2-6 Jahren einen deutlichen Peak mit einer 5-6-fach erhöhten Anzahl von mRNA-Transkripten um dann auf ein im Vergleich zu Normalkontrollen leicht erhöhtes Niveau abzufallen. Diese Dynamik macht deutlich, dass bei den älteren Patienten (> 7Jahre), die progredienten Fibrose nicht durch eine vermehrte ECM-Synthese zu erklären ist.

Auch bei dem cxmd-Hund wurde eine deutliche Abnahme der hochregulierten Expression von TGF- $\beta$ 1 nach Tag 60 nachgewiesen, parallel dazu nimmt auch die Synthese der Kollagene I,III und IV ab. Der Fibrosegrad des Muskels hat sein

---

Maximum am 15. Tag mit > 50 % und nimmt dann – im Gegensatz zu der Dynamik beim Menschen - auf 30 % ab [252,73]. Bei der mdx-Maus wurde im Alter von 8 Wochen eine signifikante Erhöhung der mRNA Expression von TGF- $\beta$ 1 im Diaphragma und im M. quadriceps nachgewiesen. Im späteren Alter war im stark fibrosierten Diaphragma keine Erhöhung der mRNA Expression mehr nachweisbar, dagegen war im nicht fibrosierten M. quadriceps die Expression von TGF- $\beta$ 1 weiter signifikant erhöht [346]. Dieser Vergleich verdeutlicht, dass neben der TGF- $\beta$ 1 vermittelten Aktivierung der TIMPs und MMPs weitere Faktoren einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung der Fibrose im Dystrophin defizienten Muskel haben müssen und dass diese Spezies abhängig variieren.

TGF- $\beta$ 1 ist ein starker chemotaktischer Faktor für Mastzellen. Diese akkumulieren im Bereich von fibrotischem Umbau und wurden auch im DMD-Muskel vermehrt nachgewiesen [130,122]. Es dürfte sich um ein Sekundärphänomen als Folge der TGF- $\beta$ 1 Aktivierung handeln.

Neben der profibrotischen Wirkung hat TGF- $\beta$ 1 auch einen direkten Einfluss auf die Myogenese. Es hemmt sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung von Satellitenzellen [5]. Diese Wirkung ist anhängig von der Interaktion mit dem myogenen Transkriptionsfaktor MEF2 [80].

## 5.6 Serologie

Anhand der Untersuchungsergebnisse wurde deutlich, dass die serologischen Untersuchungen nicht hilfreich für die Diagnostik und Verlaufsbeobachtung bei der DMD sind.

Obwohl Kollagen I und Kollagen III Hauptbestandteile der stark vermehrten ECM im DMD-Muskel sind lagen die Serumwerte im Normbereich. Lediglich bei einem Patienten mit DMD fiel ein deutlich erhöhter PICP-Wert auf, ohne dass Symptome einer anderen Erkrankung, insbesondere einer Wachstumsstörung vorlagen. Es ist davon auszugehen, dass es sich um eine gutartige genetische Variante handelt, die für den PICP-Serumwert bekannt ist [298]. Bei anderen Organfibrosen wurden wie

---

bei der zystischen Fibrose (ohne Leberbeteiligung) oder primäre Lungenfibrosen Normalwerte oder leicht erhöht Serumwerte von PICP und PIIINP gemessen [78] oder auch deutlich erhöhte Serumwerte wie bei chronischen Nierenerkrankungen [299]. Schuppan et al. [285,287] konnten zeigen, dass bei der Leberfibrose die Serumwerte zu dem Erkrankungsstadium korrelieren. Dieser Zusammenhang besteht, da zirkulierendes PICP und PIIINP von Leberendothelien abgebaut wird [293,294]. Diese Funktion ist bei der Leberfibrose in Abhängigkeit vom Grad der Erkrankung gestört und spielt bei der Fibrose des Muskels keine Rolle.

Die im DMD-Muskel fokal gesteigerte Expression von Tenascin ging nicht mit einer Erhöhung des Serumwertes einher. Tenascin war in kleiner Menge überwiegend endomyseal gelegen nachweisbar. Bei chronischen Nieren- und Lebererkrankungen, die mit einer Vermehrung der ECM einhergehen, wurden signifikant erhöhte Serumwerte von Tenascin gemessen [154,189]. Gleiches traf für Laminin P1 zu [154]. Möglicherweise spielt hier auch die unterschiedliche Regenerationsgeschwindigkeit der Organe eine wichtige Rolle.

Der Median der TIMP-1 Serumwerte war bei den DMD-Patienten nicht signifikant erhöht. Allerdings wurden bei drei von fünf Patienten im Alter von 4-7,9 Jahren erhöhte Werte gemessen. Bei der Untersuchung einer größeren Zahl von Patienten könnte die Altersstufe < 7 Jahre als eine Gruppe mit einem erhöhten Serumwert von TIMP-1 herausgearbeitet werden. In der Altersgruppe bis 7 Jahre ist auch die Expression von TGF- $\beta$ 1 am stärksten hochreguliert [26] und TGF- $\beta$ 1 aktiviert die Bildung von TIMP-1.

Bei chronischen Erkrankungen der Leber hat sich TIMP-1 als Marker für den Grad der Fibrose erwiesen [189]. Auch für die Leberfibrose bei der cystischen Fibrose [256] und den Verlauf bei der membranösen Nephropathie [2] ist der TIMP-1 Serumwert ein aussagekräftiger Parameter.

---

Nur bei der Bestimmung von Kollagen VI im Serum bestand ein signifikanter Unterschied zu den Normalkontrollen. Die erhöhten Werte traten altersunabhängig auf, d.h. auch unabhängig vom Grad der Muskelfibrose. Erhöhte Kollagen VI Werte wurden bei der Leberfibrose [289], bei der cystischen Fibrose als Prädiktor für eine Leberfibrose [115] oder bei chronischen Nierenerkrankungen [208] und der Pankreatitis nachgewiesen [203]. Dabei wird Kollagen VI als Marker des ECM-Umsatzes angesehen oder auch als Ausdruck eines irreversiblen Umbaus im Sinne eines „pathologischen remodeling“. Bemerkenswert ist, dass in der Gruppe der Patienten mit einer Cortisonbehandlung die Serumwerte von Kollagen VI nur bei zwei Patienten leicht erhöht waren und bei den übrigen Patienten im Normbereich lagen. Dieses Ergebnis muss in einer Longitudinalstudie überprüft werden. Eine Normalisierung der Kollagen VI Werte im Serum durch die Behandlung mit Cortison wäre Ausdruck einer Verminderung des ECM-Umsatzes.

### 5.7 Befunde bei anderen Myopathien

Neben den Normalkontrollen wurde auch eine heterogene Kontrollgruppe von Patienten mit anderen Myopathien untersucht. Diese Gruppe umfasste Patienten mit kongenitalen Muskeldystrophien (MCD), Gliedergürtelmuskeldystrophien (LGMD), kongenitalen Myopathien und Mitochondriopathien. Betrachtete man die gesamte Gruppe, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA Expression von MMP-1, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 und TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu den Normalkontrollen. Bei einzelnen Patienten bestand jedoch ein auffälliges Expressionsmuster. In Abbildung 5.1 ist die mRNA Expression von MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 im Muskel einer Patientin mit einer kongenitalen Muskeldystrophie mit Merosinmangel (MCD1A) dargestellt. MMP-2-Transkripte sind über den gesamten Schnitt verteilt nachweisbar, TIMP-1-Transkripte fokal im Bereich zellulärer Infiltrate bei regenerierenden und degenerierenden Muskelfasern und TIMP-2 in geringerer Ausprägung ebenfalls fokal betont im Bereich zellulärer Infiltrate. MMP-1 war nicht hochreguliert (nicht dargestellt).

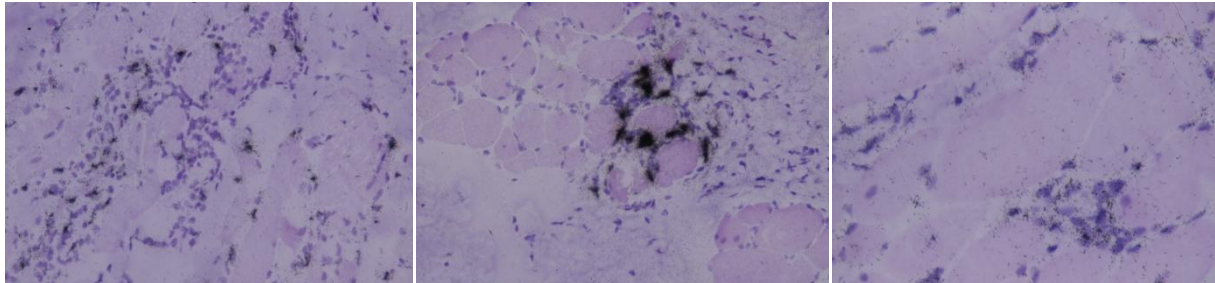


Abbildung 5.1 MCD1A-Muskel, in situ-Hybridisierung mit <sup>35</sup>S-markierten mRNA Sonden.

- |   |   |  |
|---|---|--|
| <b>a</b> MMP-2 Antisense-Sonde, x 200; verstärkte mRNA Expression in Zellen der ECM über dem gesamten Schnitt | <b>b</b> TIMP-1 Antisense-Sonde, x 200; fokal stark vermehrte mRNA Expression im Bereich de- und regenerierender Fasern | <b>c</b> TIMP-2 Antisense-Sonde, x 200; fokal mäßig vermehrte mRNA Expression im Bereich zellulärer Infiltrate |
|---|---|--|

Das Muster der mRNA Expression entspricht den bei DMD-Patienten beobachteten Veränderungen im Sinne einer Störung des ECM-Abbaus. Diese Veränderungen wurden – weniger ausgeprägt – bei den genetisch wie klinisch heterogenen kongenitalen und Gliedergürtelmuskeldystrophien ebenfalls gefunden, nicht aber bei den nicht-fibrosierenden unspezifischen Myopathien, den Strukturmyopathien und auch nicht bei den Mitochondriopathien.

Fidzianska et al. haben bereits 1982 [105] die Bedeutung von Störungen im Kollagenstoffwechsel für die kongenitalen Muskeldystrophien diskutiert. Der Merosin-negativen kongenitalen Muskeldystrophie (MCD1A) liegen Mutationen im Gen der  $\alpha 2$  Kette des Laminin2 zugrunde [317]. Auch bei dieser Muskeldystrophie ist TGF- $\beta 1$  signifikant erhöht [27] mit dem o.g. Expressionsprofil von MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2. Die Hochregulation ist weniger ausgeprägt als bei der DMD. Dies hängt möglicherweise mit dem Erkrankungsstadium zum Untersuchungszeitpunkt zusammen. Bei den Patienten mit einer MCD1A war die Fibrosierung der Muskulatur schon weit fortgeschritten. Auch bei der DMD nimmt TGF- $\beta 1$  im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium wieder ab [26].

---

Die Untersuchungsergebnisse an nonDMD-Muskeln (MCD1A, andere LGMD) zeigen, dass die TGF- $\beta$ 1 assoziierten Veränderungen bei der DMD zwar besonders ausgeprägt sind, sie sind aber nicht spezifisch für die DMD.

## 5.8 Proliferation und Differenzierung

Die Muskeldystrophie Duchenne wird durch Mutationen im DMD-Gen verursacht. Die Mutationen führen zu einem hochgradigen Mangel an Dystrophin. Das subsarkolemmal gelegene Dystrophin spielt für die Stabilität und Funktion von Muskelzellen eine entscheidende Rolle. Durch den Dystrophinmangel kommt es zu Muskelfasernekrosen und zum intrazellulären Kalziumanstieg. Es tritt eine entzündliche Reaktion mit zellulären Infiltraten, Aktivierung von Zytokinen und Interleukinen und einer vermehrten ECM-Synthese mit Hochregulation ECM abbauender Proteasen und ihrer Inhibitoren auf. Es werden Satellitenzellen aktiviert, die proliferieren und bis zu Muskelfasern ausreifen (Abbildung 5.2, Schritte 1-4). Diese physiologischen Regenerationsschritte laufen auch nach einem mechanischem Muskeltrauma oder bei einer Myositis ab. Es ist bislang nicht geklärt, über welche Mechanismen diese Aktivierungsprozesse nach Abschluss der Regeneration des Muskels wieder herunter reguliert werden.

Im DMD-Muskel findet einerseits diese physiologische Regeneration zu reifen Muskelfasern statt, andererseits entwickelt sich eine zunehmende Fibrose, die den histologischen Befund im Verlauf dominiert und die myogene Regeneration inhibiert (Abbildung 5.2, Schritte 5-9). Bei den Dystrophinopathien des Menschen besteht ein Zusammenhang zwischen dem Phänotyp und dem Ausmaß des Dystrophinmangels und häufig auch zwischen dem Ausmaß des Dystrophinmangels und dem Grad der Muskelfibrose. Der Vergleich mit anderen Spezies mit einer Dystrophinopathie unterstreicht, dass der Dystrophinmangel allein weder den klinischen Krankheitsverlauf noch die morphologischen Veränderungen des Muskels erklärt (Tabelle 5.1).



Tabelle 5.1

**Muskelfibrose, TGF- $\beta$ 1-Konzentration, Dystrophinstatus und Verlaufstyp bei verschiedenen Dystrophinopathien; cxmd: X-gebundene Muskeldystrophie des Hundes ; mdx: X-gebundene Muskeldystrophie der Maus; \*Extremitätenmuskel; Dys: Dystrophin**

| Spezies   | Histologie     | TGF $\beta$ 1 | Verlauf             | Dys |
|-----------|----------------|---------------|---------------------|-----|
| DMD       | Frühe Fibrose  | +++           | schwer, progredient | -   |
| BMD       | Späte Fibrose  | +             | leicht              | +   |
| mdx Maus  | Späte Fibrose* | ++            | leicht              | -   |
| cxmd Hund | Frühe Fibrose  | +++           | schwer, stabil      | -   |

Sowohl die mdx-Maus als auch der cxmd-Hund sind Dystrophin-negativ. Bei der mdx Maus besteht im Bereich der Extremitätenmuskulatur nach einer Phase intensiver Muskeldegeneration und -regeneration in der 4.-8. Woche ein myopathisches Bild ohne wesentliche Vermehrung des Bindegewebes. Der klinische Phänotyp ist mild, erst bei dem älteren Tier wird die Muskelschwäche deutlicher [253,254]. Im Gegensatz dazu besteht am Diaphragma frühzeitig eine ausgeprägte Fibrose [303]. Sowohl im Diaphragma als auch im Extremitätenmuskel war TGF- $\beta$ 1 initial hochreguliert. Bereits im Alter von 12 Wochen war im Diaphragma keine signifikante Erhöhung der mRNA Expression von TGF- $\beta$ 1 mehr nachweisbar [124], dagegen war im kaum fibrosierten M. quadriceps die Expression von TGF- $\beta$ 1 weiter signifikant erhöht [346].

Bei dem cxmd-Hund, dessen Phänotyp der DMD am nächsten kommt, wurde nach Tag 60 eine Abnahme der Expression von TGF- $\beta$ 1 nachgewiesen. Parallel dazu war auch die Synthese der Kollagene I,III und IV rückläufig. Der Fibrosegrad des Muskels nahm von über 50 % der Schnittfläche am 15. Tag auf 30% ab [252,73].

Dagegen sind beim DMD-Patient der klinische Befund und die histologischen Veränderungen auch nach Abnahme der TGF- $\beta$ 1 Expression weiter progredient.

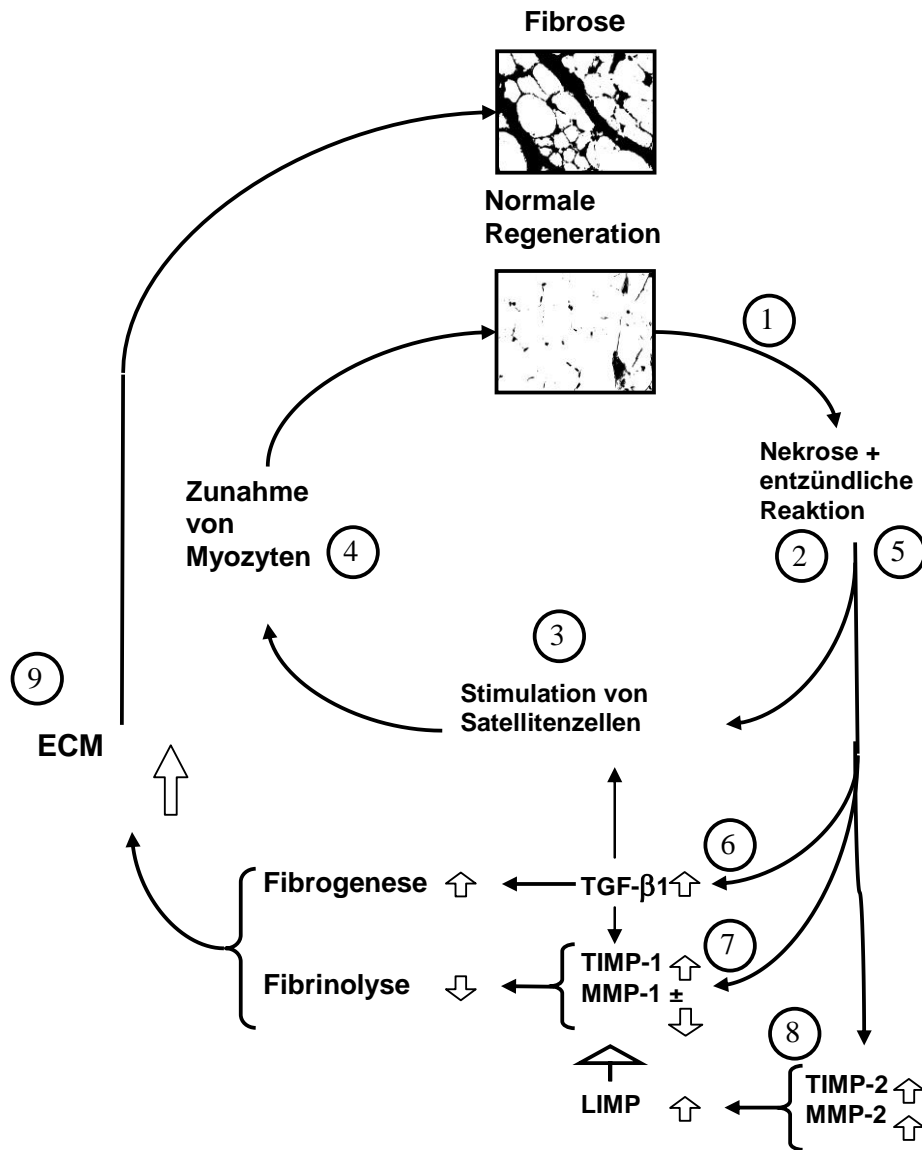


Abbildung 5.2

- (1) Muskelzellschädigung
- (2) physiologische Regeneration mit zellulärer Reaktion und passagerem Auftreten von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und ECM-Komponenten
- (3) Stimulation von Satellitenzellen
- (4) Ausreifung von Muskelzellen
- (5) bei rezidivierender Schädigung permanente Stimulation fibrogener Faktoren
- (6) Vermehrung von TGF-β1 hemmt MMP-1 und die Proliferation von Satellitenzellen
- (7) Vermehrung von TIMP-1 und Hemmung von MMP-1
- (8) TIMP-2 und MMP-2 können den LIMP bilden, der MMP-1 hemmt
- (9) das Ungleichgewicht zwischen Fibrogenese und Fibrinolyse führt zu progredienter Muskelfibrose.

---

Bei den drei Dystrophin-negativen Spezies kommt es also zu Beginn der Erkrankung zu einer Hochregulation von TGF- $\beta$ 1 mit Aktivierung von TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 und MMP-9, wie es auch von anderen Organfibrosen bekannt ist [38,144,131,33]. Neben der Aktivierung von MMPs und TIMPs kann TGF- $\beta$ 1 die Differenzierung von myogenen Zellen in fibrogene Zellen induzieren [199]. Bei fortgeschrittener Fibrose nimmt die Expression von TGF- $\beta$ 1 im Muskel wieder ab (Diaphragma der mdx-Maus, Extremitätenmuskel DMD-Patient und cxmd-Hund). Trotz dieser pathophysiologischen Gemeinsamkeiten bestehen deutliche Unterschiede des Krankheitsverlaufs bei den dystrophin-negativen Spezies. Es müssen daher Spezies-spezifische modifizierende Faktoren vorhanden sein. Im kaum fibrotischen Extremitätenmuskel der mdx-Maus persistiert eine signifikant erhöhte Expression von TGF- $\beta$ 1, d.h. dass der Stimulus für die Expression von TGF- $\beta$ 1 an das Vorhandensein von ausreichend vorhandenem Muskelgewebe gekoppelt ist und dass der mdx-Extremitätenmuskel über eine höhere antifibrotische Kapazität verfügt als das Diaphragma.

Die Expression von bFGF ist bei der mdx-Maus stärker hochreguliert als bei dem DMD-Patienten und dem cxmd-Hund; bFGF wird bei der Muskelentwicklung mit myogenen Wachstumsfaktoren koexprimiert [110] und wurde in geschädigten und regenerierenden Muskelfasern nachgewiesen und nicht in fibrogenen Zellen. Diese Proteindarstellung entsprach der der Regeneration nach einem experimentellem Trauma [7] und wurde als Ausdruck der proregeneratorischen Aktivität von bFGF gewertet. Es wurde gezeigt, dass die Satellitenzellen bei der mdx-Maus sensitiver für eine Stimulation mit bFGF sind als die Fibroblasten, so dass eine Aktivierung des myogenen Zellpools ohne die Aktivierung der Fibroblasten möglich erscheint [85]. Auch aFGF war bei der mdx-Maus während der aktiven Degenerations-/Regenerationsphase massiv hochreguliert; daraus leiteten die Autoren die Hypothese ab, dass Mechanismen, mit denen der mdx-Muskel seinen gute Regenerationsfähigkeit erhält, den aFGF mit einschließen [248].

Die Expression des Proteoglykans Decorin, einem Gegenspieler von TGF- $\beta$ 1, war bei der DMD und der MDC1A schwächer ausgeprägt als bei der BMD,

---

Dysferlinopathien oder Sarkoglykanopathien [344]. Damit ist von einer stärkeren Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auszugehen. Es wurden auch Unterschiede der MMP-vermittelten Proteolyse von  $\beta$ -Dystroglykan zwischen verschiedenen Muskeldystrophien nachgewiesen [209]. Ein proteolytischer Abbau - und damit eine massive Störung des DAP - wurde nur bei der DMD und den Sarkoglykanopathien nachgewiesen, nicht bei der BMD, Miyoshi-Myopathie, der kongenitalen Fukuyama Muskeldystrophie und anderen Myopathien.

Die progressiven Veränderungen des Muskels wurden als Erschöpfung der myogenen Regenerationsfähigkeit interpretiert. Oexle und Kohlschütter haben diese Hypothese detailliert diskutiert und konnten herausarbeiten, dass die Ursache der progredienten Muskelfibrose bei der DMD eher Ausdruck einer gestörten Differenzierung ("misdirected regeneration") als Ausdruck einer „replikativen Alterung“ der myogenen Regeneration ist [246]. Es entwickelt sich eine „Milieu bedingte“ Differenzierungsstörung, die auch erklären würde, warum der Transfer von Myoblasten gesunder Verwandter nicht zu einer signifikanten Dystrophinexpression führt [217,225]. Interessanterweise ließ sich als Ausdruck eines „fibrogenen Milieus“ bereits in DMD-Myotuben das gleiche Expressionsmuster für TGF- $\beta$ 1, Decorin, TIMP-1,-2 und -3, MMP-2 und MMP-9 sowie Kollagen I und Kollagen VI wie im reifen DMD-Muskel nachweisen [344].

Die vorgelegten Ergebnisse und die Daten aus der Literatur belegen, dass der Störung des ECM-Stoffwechsel eine wichtige Rolle in der Pathogenese der DMD zukommt. Entscheidend für den Wechsel von der myogenen zur fibrogenen Regeneration scheint die rezidivierende Schädigung zu sein. An der Leber konnte gezeigt werden, dass sich die Regeneration erst nach einer wiederholten Schädigung von einer restitutio ad integrum zu einem fibrotischen Umbau wandelt [144,180]. Es ist bislang nicht bekannt, welche Faktoren diesen „Richtungswechsel“ der Regeneration entscheidend beeinflussen.

## 6 Zusammenfassung

Die DMD ist die häufigste neuromuskuläre Erkrankung im Kindesalter. Der klinische Verlauf ist durch einen kontinuierlichen Verlust der willkürmotorischen Fähigkeiten mit einer deutlich verkürzten Lebenserwartung gekennzeichnet. Die Ursache ist das Fehlen von Dystrophin aufgrund von Mutationen im *DMD*-Gen. Dystrophin ist ein subsarkolemmal gelegenes Protein, das eine zentrale Rolle für die Stabilität und Funktionstüchtigkeit von Muskelfasern spielt. Im Muskel kommt es zu Beginn zu einer intensiven De- und Regeneration von Muskelfasern mit einer inflammatorischen Reaktion, im Verlauf dominiert der fibrotische Umbau der quergestreiften Muskulatur. Der Vergleich zwischen verschiedenen Spezies mit einer Dystrophin-negativen Muskeldystrophie ergibt, dass das Fehlen von Dystrophin weder den klinischen Phänotyp noch den histologischen Befund allein erklärt.

Die Fibrose ist Ausdruck einer Störung des ECM Stoffwechsels. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Charakterisierung des ECM Stoffwechsels Komponenten der ECM dargestellt und die Expression von MMP-1 (Kollagenase 1), MMP-2 (Gelatinase A) sowie die Gewebeinhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 untersucht. Bei der hypertrophierten ECM im DMD-Muskel handelt sich um reifes Bindegewebe mit einem erhöhten Anteil fibrillärer Kollagene. Es wurde eine Herunterregulation von MMP-1 und eine Hochregulation von MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 nachgewiesen. Diese Konstellation entspricht dem Aktivierungsmuster durch TGF- $\beta$ 1, das signifikant vermehrt im DMD-Muskel ist. Durch den Mangel an MMP-1 kommt es zu einer Störung des Abbaus fibrillärer Kollagene im DMD-Muskel. Dieses Muster der Hemmung und Aktivierung von MMPs und TIMPs wurde auch bei anderen Erkrankungen nachgewiesen, die mit einer Organfibrose einhergehen.

Es hat sich gezeigt, dass die serologischen Untersuchungen von Kollagen I, Kollagen III, Tenascin und TIMP-1 nicht hilfreich für die Erfassung und Verlaufsdokumentation der Muskelfibrose sind. Lediglich die Serumwerte von Kollagen VI waren bei Patienten mit DMD erhöht, unabhängig vom Grad der Muskelfibrose. Eine Kontrollgruppe von DMD-Patienten mit einer Steroidtherapie

hatte normale Serumwerte von Kollagen VI. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Bestimmung von Kollagen VI im Serum für das Therapiemonitoring hilfreich sein kann, sie bedürfen der Überprüfung durch eine Longitudinalstudie.

Die vorliegenden Daten sprechen dafür, dass es bei der DMD zur einer fehlgerichteten, fibrogenen Regeneration der quergestreiften Muskulatur kommt. Diese ist Folge der rezidivierenden Schädigung der Muskelfasern, die zu einer anhaltenden Entstehung eines „fibrogenen Milieus“ führt.

Da zur Zeit keine kurative Therapie zur Verfügung steht, ist es sinnvoll über Möglichkeiten einer antifibrotischen Behandlung nachzudenken. Die bislang einzig wirksamen pharmakologischen Behandlungen mit Kortison oder Ciclosporin A zielen auf die entzündlich/immunologischen Reaktionen im Muskel ab. Die Immunmodulation von TGF- $\beta$ 1 verhinderte bei der mdx-Maus die Proliferation des Bindegewebes, führte aber zu einer Verstärkung der entzündlichen Veränderungen [9]. Reed et al. konnten zeigen, dass Decorin als TGF- $\beta$ 1-Inhibitor die Entwicklung der Fibrose des Diaphragmas bei der mdx-Maus verhindern kann [270]. Weitere Ansatzpunkte wären die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden gegen TGF- $\beta$ 1 oder TIMP-1 oder der Einsatz des Antiöstrogens Tamoxifen, das über eine antifibrotische Wirkung durch die Antagonisierung von TGF- $\beta$ 1 verfügt.

---

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Adams AM, Harding PL, Iversen PL, Coleman C, Fletcher S, Wilton SD. 2007. Antisense oligonucleotide induced exon skipping and the dystrophin gene transcript: cocktails and chemistries. *BMC Mol Biol.* 2:8-57
- 2 Akiyama K, Shikata K, Sugimoto H, Matsuda M, Shikata Y, Fujimoto N, Obata K, Matsui H, Makino H. 1997. Changes in serum concentrations of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and type IV collagen in patients with various types of glomerulonephritis. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 95:115-128
- 3 Aldenborg F, Nilsson K, Jarlshammer B, Bjermer I, Enerback L. 1993. Mast cells and biogenic amines in radiation-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8:112-117
- 4 Alderton JM, Steinhardt RA. 2000. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc Med* 10:268-272
- 5 Allen RE, Boxhorn LK. 1989. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 138:311-315
- 6 Alvarez K, Fadic R, Brandan E. 2002 Augmented synthesis and differential localization of heparan sulfate proteoglycans in Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Biochem* 85:703-713
- 7 Anderson JE, Kakulas BA, Jacobsen PF, Johnsen RD, Kornegay JN, Grounds MD. 1993. Comparison of basic fibroblast growth factor in x-linked dystrophin-deficient myopathies of human, dog and mouse. *Growth factors* 9:107-121
- 8 Andrade FH, Porter JD, Kaminski HJ. 2000. Eye muscle sparing by the muscular dystrophies: lessons to be learned? *Microsc Res Tech* 2000 48:192-203
- 9 Andreetta F, Bernasconi P, Baggi F, Ferro P, Oliva L, Arnoldi E, Cornelio F, Mantegazza R, Confalonieri P. 2006. Immunomodulation of TGF-beta 1 in mdx mouse inhibits connective tissue proliferation in diaphragm but increases inflammatory response: implications for antifibrotic therapy. *J Neuroimmunol* 175:77-86

- 
- 10 Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P. 1987. 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol Cell Biol* 7:2256-2266
  - 11 Annane D, Chevrolat JC, Chevret S, Raphael JC. 2000. Nocturnal mechanical ventilation for chronic hypoventilation in patients with neuromuscular and chest wall disorders. *Cochrane Database Syst Rev.*(2):CD001941
  - 12 Arahata K, Ishiura S, Ishiguro T, Tsukahara T, Suhara Y, Eguchi C, Ishihara T, Nonaka I, Ozawa E, Sugita H. 1988. Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature* 333:861-863
  - 13 Arikawa E, Tadayuki I, Nonaka I, Sugita H, Arahata K. 1991. Immunocytochemical analysis of dystrophin in congenital muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 105:79-87
  - 14 Atkinson JC, Rühl M, Becker J, Ackermann R, Schuppan D. 1996. Collagen VI regulates normal and transformed mesenchymal cell proliferation in vitro. *Exp Cell Res* 228:283-291
  - 15 Azofeifa J, Voit T, Hübner C, Cremer M. 1995. X-chromosome methylation in manifesting and healthy carriers of dystrophinopathies: concordance of activation ratios among first degree female relatives and skewed inactivation as cause of the affected phenotypes. *Hum Genet* 96:167-176.
  - 16 Bach J, McKeon J. 1991. Orthopedic surgery and rehabilitation for the prolongation of brace-free ambulation of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Rehabil* 70:323-331
  - 17 Bach JR, Ishikawa Y, Kim H. 1998. Prevention of pulmonary morbidity for patients with Duchenne muscular dystrophy. *Chest* 112:1024-1028
  - 18 Bakker JP, de Groot IJ, Beckerman H, de Jong BA, Lankhorst GJ. 2000. The effects of knee-ankle-foot orthoses in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: review of the literature. *Clin Rehabil.* 14:343-359
  - 19 Bakker JP, De Groot IJ, Beelen A, Lankhorst GJ. 2002. Predictive factors of cessation of ambulation in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Phys Med Rehabil* 81:906-912



- 
- 20 Baron P, Scarpini E, Meola G, Santilli I, Conti G, Pleasure D, Scarlato G. 1994. Expression of the low-affinity NGF receptor during human development, regeneration, and in tissue culture. *Muscle Nerve* 17:276-284
- 21 Barresi R, Michele DE, Kangawa M, Harper HA, Dovico SA, Satz JS, Moore SA, Zhang W, Schachter H, Dumanski JP, Cohn RD, Nishino I, Campbell KP. 2004. LARGE can functionally bypass alpha-dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med* 117:953-964
- 22 Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeny HL. 1999. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscle of mdx mice. *J Clin Invest* 104:373-381
- 23 Barton ER, Moris L, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. 2002. Muscle-specific expression of insulin-like-growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol* 157:137-148
- 24 Bauer M, Dieterich W, Ehnis T, Schuppan D. 1997. Complete primary structure of human collagen type XIV (undulin). *Biochim Biophys Acta* 1354:183-188
- 25 Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K, Specht L, Shapiro F, Angelini C, Sugita H, Kunkel LM. 1991. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet* 49:54-67
- 26 Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, Brugnoli R, Barresi R, Mora M, Cornelio F, Morandi L, Mantegazza R. 1995. Expression of the transforming factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. *J Clin Invest* 96:1137-1144
- 27 Bernasconi P, Di Blasi C, Mora M, Morandi L, Galbiati S, Confalonieri P, Cornalio F, Mantegazza R. 1999. Transforming growth factor- $\beta$ 1 and fibrosis in congenital muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 9:28-33
- 28 Bertolotto A, Palmucci L, Doriguzzi C, Mongini T, Gagnor E, Del Rosso M, Tarone G. 1983. Laminin and fibronectin distribution in normal and pathological human muscle. *J Neurol Sci* 60:377-382
- 29 Bertolotto A, Palmucci L, Gagliano A, Mongini T, Tarone G. 1986. Immunohistochemical localization of chondroitin sulfate in normal and pathological human muscle. *J Neurol Sci* 73:233-244

- 
- 30 Biggar WD, Harris VA, Eliasoph L, Alman B. 2006. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscul Disord.* 16:249-255
  - 31 Billard C, Gillet P, Barthez M, Hommet C, Bertrand P. 1998. Reading ability and processing in Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Dev Med Child Neurol* 40:12-20
  - 32 Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE, Knight AE, Winder SJ, Kendrick-Jones J. 1995. Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci.* 20:133-135
  - 33 Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342:1350-1358
  - 34 Bode W, Gomis-Rüth FX, Stöcker W. 1993. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-return) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS lett* 331:134-140
  - 35 Bonifati MD, Ruzza G, Bonometto P, Berardinelli A, Gorni K, Orcesi S, Lanzi G, Angelini C. 2000. A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 23:1344-1347
  - 36 Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, Hayes AP, Salviati G, DiMauro S, Kunkel LM, Hoffman EP, Rowland LP. 1988. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 54:447-452
  - 37 Bonnemann CG, McNally EM, Kunkel LM. 1996. Beyond dystrophin: current progress in the muscular dystrophies. *Curr Opin Pediatr.* 8:569-582
  - 38 Border WA, Noble NA. 1994. Transforming growth factor- $\beta$  in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331:1286-1292
  - 39 Bourne GH, Gollarz MN. 1959. Human muscular dystrophy as an aberration of the connective tissue. *Nature* 4677:1741-1743

- 
- 40   Bowe MA, Mendis DB, Fallon JR. 2000. The small leucine-rich repeat proteoglycan biglycan binds to  $\alpha$ -dystroglycan and is upregulated in dystrophic muscle. *J Cell Biol* 148:801-810
  - 41   Brennan JE, Clao DS, Honhui X, Aldape K, Bredt DS. 1995. Nitric Oxide synthase complexed with and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82:743-752
  - 42   Bresolin N, Castelli E, Comi P, Felisari G, Bardoni A, Perani D, Grassi F, Turconi A, Mazzucchelli F, Gallotti D, Moggio M, Prella A, Ausenda C, Fazio G, Scarlato G. 1994. Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 4:359-369
  - 43   Brocks DG, Strecker H, Neubauer HP, Timpl R. 1986. Radioimmunoassay of laminin in serum and its application to cancer patients. *Clin Chem* 32:787-791
  - 44   Brown SC, Lucy JA. 1997. Functions of Dystrophin. In: Brown SC, Lucy JA (eds). *Dystrophin: Gene, protein and cell biology*. Cambridge University Press, 163-192
  - 45   Bullard KM, Lund L, Mudgett JS, Mellin TN, Hunt TK, Murphy B, Ronan J, Werb Z, Banda MJ. 1999. Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Ann Surg* 230:260-265
  - 46   Burghes AHM, Logan C, Hu X, Belfall B, Worton RG, Ray PN. 1987. A cDNA clone from the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene. *Nature* 328:434-437
  - 47   Burr IM, Asayama K, Fenichel GM. 1987. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in neuromuscular disease. *Muscle Nerve* 10:150-154
  - 48   Bushby KM, Tambyayah M, Gardner-Medwin D. 1991. Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet* 337:1022-1024
  - 49   Bushby KM, Appleton R, Anderson LV, Welch JL, Kelly P, Gardner-Medwin D. 1995. Deletion status and intellectual impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 37:260-269
  - 50   Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, Schade van Westrum S, Crabbe T, Clements J, d'Ortho MP, Murphy G. 1998. The TIMP2 membrane

- 
- type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem* 273:871-880
- 51 Camacho Vanegas O, Bertini E, Zhang RZ, Petrini S, Minosse C, Sabatelli P, Giusti B, Chu ML, Pepe G. 2001. Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutation in collagen type VI. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7516-7521
- 52 Campbell KP, Kahl SD. 1989. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 338:9161-9165
- 53 Carlson CG. 1998. The dystrophinopathies: an alternative to the structural hypothesis. *Neurobiol Dis.* 5:3-15
- 54 Carmeleit P, Moons L, Lijnen R, Crawley J, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiro SD, Lupu F, Collen D. 1997. Plasmin predisposes to atherosclerotic aneurysm formation by activation of matrix metalloproteinases. *Nat Genet* 96:318-326
- 55 Carpenter JL, Hoffman EP, RomanulFCA, Kunkel LM, Rosales RK, Ma NSF, Dasbach JJ, Rea JF, Moore FM, McAfee MB, Pearce LK. 1989. Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am J Pathol* 135:909-919
- 56 Carrino DA, Sorrell JM, Caplan AI. 1999. Dynamic expression of proteoglycans during chicken skeletal muscle development and maturation. *Poult Sci* 78:769-777
- 57 Cazzato G. 1968. Consideration about a possible role played by connective tissue proliferation and vascular disturbance in the pathogenesis of progressive muscular dystrophy. *Europ Neurol* 1:158-179
- 58 Chang C, Werb Z. 2001. The many faces of metalloproteinases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11:37-43
- 59 Chen YW, Nagaraju K, Bakay M, McIntyre O, Rawat R, Shi R, Hoffman EP. 2005. Early onset of inflammation and later involvement of TGFbeta in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 65:826-834
- 60 Chen YW, Zhao P, Borup R, Hoffman EP. 2000. Expression profiling in the muscular dystrophies: Identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J Cell Biol* 151:1321-1336

- 
- 61 Chiquet-Ehrismann R. 2004. Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36:986-990
- 62 Choi YC, Dalakas MC. 2000. Expression of matrix metalloproteinases in the muscle of patients with inflammatory myopathies. *Neurology* 54:65-71
- 63 Chu TM, Kawinski E. 1998. Plasmin, substilisin-like endoproteases, tissue plasminogen activator, and urokinase plasminogen activator are involved in activation of latent TGF-beta 1 in human seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 253:128-134
- 64 Cockett MI, Murphy G, Birch ML, O'Connell JP, Crabbe T, Millican AT, Hart IR, Docherty AJ. 1998. Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. *Biochem Soc Symp* 63:295-313
- 65 Colombatti A, Bonaldi P. 1991. The superfamily of Proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of the extracellular matrix, homeostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood* 77:2305-2315
- 66 Comi GP, Prelle A, Bresolin N, Moggio M, Bardoni A, Gallanti A, Vita G, Toscano A, Ferro MT, Bordoni A, Fortunato F, Ciscano P, Felisari G, Tedeschi S, Castelli E, Garghentino R, Turconi A, Fraschini P, Marchi E, Negretto GG, Adobbati L, Meola G, Tonin P, Papadimitriou A, Scarlato G. 1994. Clinical variability in Becker muscular dystrophy. Genetic, biochemical and immunohistochemical correlates. *Brain*. 117:1-14
- 67 Connolly AM, Schierbecker J, Renna R, Florence J. 2002. High dose weekly oral prednisone improves strength in boys with Duchenne muscular dystrophy.. *Neuromuscul Disord*. 12:917-925
- 68 Constantin B, Sebille S, Cognard C. 2006. New insights in the regulation of calcium transfers by muscle dystrophin-based cytoskeleton: implications in DMD. *J Muscle Res Cell Motil* 27:375-386
- 69 Cooper BJ, Winand NJ, Stedman H, Valentine BA, Hoffman EP, Kunkel LM, Scott MO, Fischbeck KH, Kornegay JN, Avery RJ, Williams JR, Schmickel RD, Sylvester JE. 1988. The homologue of Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 334 :154-156

- 
- 70 Cordone G, Bado M, Morreala G, Pedemonte M, Minetti C. 1996. Severe dystrophinopathy in a patient with congenital hypotonia. *Child's Nerv Syst* 12:466-469
- 71 Cotton SM, Voudouris NJ, Greenwood KM. 2005. Association between intellectual functioning and age in children and young adults with Duchenne muscular dystrophy: further results from meta-analysis *Dev Med Child Neurol* 47:257-265
- 72 Cox GF, Kunkel LM. 1997. Dystrophies and heart disease. *Curr Opin Cardiol* 12:329-343
- 73 Cozzi F, Cerletti M, Luvoni GC, Lombardo R, Brambilla PG, Faverzani S, Blasevich F, Cornelio F, Pozza O, Mora M. 2001. Development of muscle pathology in canine X-linked muscular dystrophy. II. Quantitative characterization of histopathological progression during postnatal skeletal muscle development. *Acta Neuropathol* 101:469-478
- 74 Cullen MJ. Muscle regeneration. In: Brown SC, Lucy JA (eds). *Dystrophin: Gene, protein and cell biology*. Cambridge University Press 1997;233-264
- 75 Culligan KG, Mackey AJ, Finn DM, Maguire PB, Ohlendieck K. 1998. Role of dystrophin isoforms and associated proteins in muscular dystrophy. *Int J Mol Med*. 2(6):639-648
- 76 Dallas SL, Miyazono K, Skerry TM, Mundy GR, Bonewald LF. 1995. Dual role for the latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein in storage of latent TGF- $\beta$  in the extracellular matrix and as a structural matrix protein. *J Cell Biol* 131:539-549
- 77 D'Amore PA, Brown RH, Ku PT, Hoffman EP, Watanabe H, Arahata K. 1994. Elevated basic fibroblast growth factor in the serum of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 35:362-365
- 78 Danne T. 1995. Untersuchungen zum Stoffwechsel der extrazellulären Matrix im Kindesalter- mit besonderer Berücksichtigung des Diabetes mellitus. Habilitationsschrift Freie Universität Berlin. S.65-75
- 79 Deák F, Wagener R, Kiss I, Paulsson M. 1999. The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol* 18:55-64

- 
- 80 De Angelis L, Borghi S, Melchionna R, Berghella L, Baccarani-Contri M, Parise F, Ferrari S, Cossu G. 1998. Inhibition of myogenesis by transforming growth factor  $\beta$  is density-dependent and related to the translocation of transcription factor MEF2 to the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci* 95:12358-12363
- 81 De Bari C, Dell'Accio, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. 2003. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 160:909-918
- 82 Deconinck N, Ragot T, Maréchal G, Perricaudet M, Gillis JM. 1996. Functional protection of dystrophic mouse (mdx) muscles after adenovirus-mediated transfer of a dystrophin minigene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:3570-3574
- 83 Deconinck AE, Tinsley J, De Backer F, Fisher R, Kahn D, Phelps S, Davies KE, Gilles JM. 1997. Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice. *Nat Med* 3:1216-1221
- 84 van Deutekom JC, Bremmer-Bout M, Janson AA, Ginjaar IB, Baas F, den Dunnen JT, van Ommen GJ. 2001. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet.* 10/15:1547-1554
- 85 DiMario J, Strohman RC. 1988. Satellite cells from dystrophic (mdx) mouse muscle are stimulated by fibroblast growth factor in vitro. *Differentiation* 39:42-49
- 86 DiMario J, Buffinger N, Yamada S, Strohman RC. 1989. Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science* 244:688-690
- 87 Dubowitz V, Kinali M, Main M, Mercuri E, Muntoni F. 2002. Remission of clinical signs in early duchenne muscular dystrophy on intermittent low-dosage prednisolone therapy. *Eur J Paediatr Neurol* 6:153-159
- 88 Duance VC, Stephens HR, Dunn M, Bailey AJ, Dubowitz V. 1980. A role of collagen in the pathogenesis of muscular dystrophy. *Nature* 284:470-472
- 89 Dudley RW, Lu Y, Gilbert R, Matecki S, Nalbantoglu J, Petrof BJ, Karpati G. 2004. Sustained improvement of muscle function one year after full-length dystrophin gene transfer into mdx mice by a gutted helper-dependent adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 15:145-156

- 
- 90 Dunant P, Walter MC, Karpati G, Lochmüller H. 2003. Gentamycin fails to increase dystrophin expression in dystrophin-deficient muscle. *Muscle Nerve* 27:624-627
- 91 Eagle M, Baudouin SV, Chandler C, Giddings DR, Bullock R, Bushby K. 2002. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvement in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscul Disord* 12:926-929
- 92 Eagle M, Bourke J, Bullock R, Gibson M, Mehta J, Giddings D, Straub V, Bushby K. 2007. Managing Duchenne muscular dystrophy--the additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscul Disord* 17:470-475
- 93 Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkötter O, Shephard P, Mauch C, Krieg T. 2000. Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol.* 19:325-332
- 94 Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJP, Angel P, Heath JK. 1987. Transforming growth factor- $\beta$  modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 6:1899-1904
- 95 Emery AEH. 1991. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a world survey. *Neuromuscul Disord* 1:19-29
- 96 Endo T, Nakabayashi K, Sekiuchi M, Kuroda T, Soejima A, Yamada A. 2006. Matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the peripheral blood of patients with various glomerular diseases and their implication in pathogenetic lesions: study based on an enzyme-linked assay and immunohistochemical staining. *Clin Exp Nephrol.* 10:253-261
- 97 Engel AG, Yamamoto M, Fischbeck KH. Dystrophinopathies. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C (eds). *Myology* 3. ed. New York: McGraw-Hill 2004;1133-1187
- 98 Engvall E, Wewer UM. 1996. Domains of Laminin. *J Cell Biochem* 61:493-501
- 99 Engvall E, Wewer UM. 2003. The new frontier in muscular dystrophy research: booster genes. *FASEB J* 17:1579-1584



- 
- 100 Ensing MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkidsen B, Lund LR, Henriksen K, Lenhard T, Foged NT, Werb Z, Delaisse JM. 2000. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol* 151:879-890
  - 101 Ervasti JM, Campbell KP. 1991. Membrane organisation of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66:1121-1131
  - 102 Ervasti JM, Campbell KP. 1993. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122:809-823
  - 103 Feener CA, Koenig M, Kunkel LM. 1989 Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 338:509-511
  - 104 Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. 1998. Muscle regeneration by marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528-1530
  - 105 Fidzianska A, Goebel HH, Lenard HG, Heckmann C.J. 1982. Congenital muscular dystrophy (CMD) - a collagen formative disease? *Neurol Sci* 55:79-90
  - 106 Figarella-Branger D, Baeta Machado AM, Putzu GA, Malzac P, Voelckel MA, Pellissier JF. 1997. Exertional rhabdomyolysis and exercise intolerance revealing dystrophinopathies. *Acta Neuropathol* 94:48-53
  - 107 Fisher KJ, Jooss K, Alston J, Yang Y, Haecker SE, High K, Pathak R, Raper SE, Wilson JM. 1997. Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med.* 3:306-312
  - 108 Forst R, Forst J. 1995. Importance of lower limb surgery in Duchenne muscular dystrophy. *Arch Orthop Trauma Surg* 114:106-111
  - 109 Fukushima K, Nakamura A, Ueda H, Yuasa K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda S. 2007. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). *BMC Musculoskelet Disord* 28:8-54
  - 110 Garrett KL, Anderson JE. 1995. Colocalization of bFGF and the myogenic regulatory gene myogenin in dystrophic mdx muscle precursors and young myotubes in vivo. *Dev Biol* 169:596-608

- 
- 111 Gaschen FP, Hoffman EP, Gorospe JRM, Uhl EW, Senior DF, Cardinet GH, Pearce LK. 1992. Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy. *J Neurol Sci* :149-159
- 112 Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR, Palka C, De Angelis MV, Di Muzio A, Guanciali-Franchi P, Calabrese G, Uncini A, Stuppia L. 2005. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet.* 117:92-98
- 113 Genovese C, Rowe D, Kream B. 1984. Construction of DNA sequences complementary to rat alpha 1 and alpha 2 collagen mRNA and their use in studying the regulation of type I collagen synthesis by 1,25-dihydroxyvitamin D. *Biochemistry* 23:6210-6216
- 114 George DK, Ramm GA, Powell LW, Fletcher LM, Walker NI, Cowley LL, Ceawford DHG. 1998. Evidence for altered hepatic matrix degeneration in genetic haemochromatosis. *Gut* 42:715-720
- 115 Gerling B, Becker M, Staab D, Schuppan D. 1997. Prediction of liver fibrosis according to serum collagen VI level in children with cystic fibrosis. *New Engl J Med* 336:1611-1612
- 116 Gianelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. 1999. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277:225-228
- 117 Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH. 2002 beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalizing mRNA-levels. *Thorax* 57:765-770
- 118 Goldring K, Jones GE, Watt DJ. 2000. A factor implicated in the myogenic conversion of nonmuscle cells derived from the mouse dermis. *Cell Transplant* 9:519-529
- 119 Goldspink G, Fernandes K, Williams PE, Wells DJ. 1994. Age-related changes in collagen gene expression in the muscles of mdx dystrophic and normal mice. *Neuromuscul Disord* 3/4:183-191
- 120 Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74:111-122

- 
- 121 Gomis-Rüth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W. 1997. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 389:77-81
- 122 Gorospe JRM, Tharp MD, Hinckley J, Kornegay JN, Hoffman EP. 1994. A role of mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy? *J Neurol Sci* 122:44-56
- 123 Gospe SM, Lazaro RP, Lava NS, Grootsholten PM, Scott MO, Fischbeck KH. 1989. Familial X-linked myalgia and cramps. *Neurology* 39:1277-1280
- 124 Gosselin LE, Williams JE, Deering M, Brazeau D, Koury S, Martinez DA. 2004. Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve* 30:645-653
- 125 Gosselin LE, Williams JE, Personius K, Farkas GA. 2007. A comparison of factors associated with collagen metabolism in different skeletal muscles from dystrophic (mdx) mice: impact of pirfenidone. *Muscle Nerve* 35:208-216
- 126 Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. 1996. Molecular cloning and characterisation of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 271:30375-30380
- 127 Gregory LG, Waddington SN, Holder MV, Mitrophanous KA, Buckley SMK, Mosley KL, Bigger BW, Ellard FM, Walmsley LE, Lawrence L, Al-Allaf F, Kingsman S, Coutelle C, Themis M. 2004. Highly efficient EIVAV-mediated in utero gene transfer and expression in the major muscle groups affected by Duchenne muscular dystrophy. *Gene Therapy* 11:1117-1125
- 128 Griggs RC, Moxley RT, Mendell JR, Fenichel GM, Brooke MH, Pestronk A, Miller JP, Cwik VA, Panday S, Robison J, King W, Signore L, Scierbecker J, Florence J, Metheson-Burden N, Wilson B. 1993. Duchenne dystrophy: Randomized, controlled trial of prednisone (18 months) and azathioprine (12 months). *Neurology* 43:520-527
- 129 Grounds MD, Torrisi J. 2004. Anti-TNF $\alpha$  (Remicade®) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J* 18:676-682
- 130 Gruber BL, Marchese MJ, Kew RR. 1994. Transforming growth factor- $\beta$ 1 mediates mast cell chemotaxis. *J Immunol* 152:5860-5867

- 
- 131 Günther U, Schuppan D, Bauer M, Matthes M, Stallmach A, Schmitt-Gräff A, Riecken EO, Herbst H. 1999. Fibrogenesis and fibrolysis in collagenous colitis. Patterns of procollagen types I and IV, matrix metalloproteinase-1 and -13, and TIMP-1 gene expression. *Am J Pathol* 155:493-503
- 132 Guglieri M, Magri F, Comi GP. 2005. Molecular etiopathogenesis of limb girdle muscular congenital muscular dystrophies: boundaries and contiguities. *Clin Chim Acta* 361:54-79
- 133 Gullberg D, Velling T, Sjöberg G, Salmivirta K, Gaggero B, Tiger CF, Edström L, Sejersen T. 1997. Tenascin-C expression correlates with macrophage invasion in Duchenne muscular dystrophy and in myositis. *Neuromuscular Disord* 7:39-54
- 134 Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390-394
- 135 Gussoni E, Bennett RR, Muskiewicz KR, Meyerrose T, Nolte JA, Gilgoff I, Stein J, Chan YM, Lidov HG, Bönnemann CG, Von Moers A, Morris GE, Den Dunnen JT, Chamberlain JS, Kunkel LM, Weinberg K. 2002. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 110:807-814
- 136 de Haan JB, Cristiano F, Inanello R, Bladier C, Kelner MJ, Kola I. 1996. Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Genet* 5:283-292
- 137 Hantai D, Labat-Robert J, Grimaud JA, Fardeau M. 1985. Fibronectin, Laminin, Type I, III and IV collagens in Duchenne's muscular dystrophy, congenital muscular dystrophies and congenital myopathies: An immunocytochemical study. *Connect Tissue Res* 13:273-281
- 138 Hardingham TE, Fosang AJ. 1992. Proteoglycans. Many forms and many functions. *FASEB J* 6:861-870
- 139 Hasegawa M, Cuenda A, Spillantini G, Thomas GM, Buée-Scherrer V, Cohen P, Goedert M. 1998. Stress-activated protein kinase-3 interacts with PDZ domain of  $\alpha$ 1-Synthrophin. *J Biol Chem* 274:12626-12631

- 
- 140 Haslett JN, Sanoudou D, Kho AT, Han M, Bennett RR, Kohane IS, Beggs AH, Kunkel LM. 2003. Gene expression profiling of Duchenne muscular dystrophy skeletal muscle. *Neurogenetics* 4:163-171
- 141 Hayashi YK, Chou FL, Engvall E, Ogawa M, Matsuda C, Hirabayashi S, Yokochi K, Ziober BL, Kramer RH, Kaufman SJ, Ozawa E, Goto Y, Nonaka I, Tsukahara T, Wang JZ, Hoffman EP, Arahata K. 1998. Mutations in the integrin alpha7 gene cause congenital myopathy. *Nat Genet* 19:94-97
- 142 Haycock JW, MacNeil S, Jones P, Harris JB, Mantle D. 1996. Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. *Neuroreport* 8:357-361
- 143 Helbing-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, Tomé FM, Schwartz K, Fardeau M, Tryggvason K, Guicheney P. 1995. Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet* 11:216-218
- 144 Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechowski HD, Bechstein WO, Neuhaus P, Gressner AM, Schuppan D. 1997. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 150:1647-1659
- 145 Heuß DF. 1997. Light-microscopic study of insulin like growth factor II (IGF-II) and insulin like growth factor I receptor (IGF-I-R) in myopathy. *Neurol Res* 19:153-159
- 146 Hildebrand A, Romaris M, Heinegard D, Twardzik D, Border W, Ruoslahti E. 1994. Interaction of the small interstitial proteoglycans. *Biochem J* 302:527-534
- 147 Hirawat S, Welch EM, Elfring GL, Northcutt VJ, Paushkin S, Hwang S, Leonard EM, Almstead NG, Ju W, Peltz SW, Miller LL. 2007. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J Clin Pharmacol.* 47:430-444
- 148 Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919-928
- 149 Hoffman EP, Gorospe RM. 1991. The animal models of Duchenne muscular dystrophy: Windows on the pathophysiological consequences of dystrophin

- deficiency. In: Mooseker M. and Morrow J., eds: Ordering the membrane cytoskeleton trilayer. New York, Academic Press. 113-154
- 150 Hoffman EP. 1996. Clinical and histopathological features of abnormalities of the dystrophin-based membrane cytoskeleton. *Brain Pathol* 6:49-61
- 151 Hoffman EP, Dressman D. 2001. Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. *Trends in Pharmacological Science* 22:465-470
- 152 Hoogerwaard EM, van der Wouw PA, Wilde AA, Bakker E, Ippel PF, Oosterwijk JC, Majoor-Krakauer DF, van Essen AJ, Leschot NJ, de Visser M. 1999. Cardiac involvement in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 1999 95:347-351
- 153 Hopf M, Göhring W, Kohlfeldt E, Yoshihiko Y, Timpl R. 1999. Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur J Biochem* 259:917-925
- 154 Hörstrup JH, Gehrman M, Schneider B, Plöger A, Froese P, Schirop T, Kampf D, Frei U, Neumann R, Eckardt KU. 2002. Elevation of serum and urine levels of TIMP-1 and tenascin in patients with renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 17:1005-1013
- 155 Howard MT, Anderson CB, Fass U, Khatri S, Gesteland RF, Atkins JF, Flanigan KM. 2004. Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides. *Ann Neurol* 55:422-466
- 156 Hu XY, Ray PN, Worton RG. 1991. Mechanisms of tandem duplication in the Duchenne muscular dystrophy gene include both homologous and nonhomologous intrachromosomal recombination. *EMBO J* 10:2471-2477
- 157 Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. 1990. Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem* 265:11077-11082
- 158 Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. 1997. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reproduction* 93:411-422

- 
- 159 Hutter OF, Burton FL, Bovell DL. 1991. Mechanical properties of normal and mdx mouse sarcolemma: bearing on function of dystrophin. *J Muscle Res Cell Motil* 12:585-589
- 160 Iannaccone S, Quattrini A, Smirne S, Sessa M, de Rino F, Ferini-Strambi L, Nemni R. 1995. Connective tissue proliferation and growth factors in animal models of Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 128:36-44
- 161 Ibraghimor-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoprotein linking to the extracellular matrix. *Nature* 355:696-702
- 162 Jimuro Y, Nishio T, Nitta T, Stefanovic B, Choi SK, Brenner DA, Yamaoka Y. 2003. Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. *Gastroenterology* 124:445-458
- 163 Ionasescu V, Ionasescu R. 1982. Increased collagen synthesis by Duchenne myogenic clones. *J Neurol Sci* 54:79-87
- 164 Ionasescu V, Lara-Braud C, Zellweger H, Ionasescu R, Burmeister L. 1977. Fibroblast cultures in Duchenne muscular dystrophy – Alteration in synthesis and secretion of collagen and non-collagen proteins. *Acta Neurol Scand* 55:407-417
- 165 Ishitobi M, Haginoya K, Zhao Y, Ohnuma A, Minato J, Yanagisawa T, Tanabu M, Kikuchi M, Iinuma K. 2000. Elevated plasma levels of transforming growth factor beta1 in patients with muscular dystrophy. *Neuroreport* 11:4033-4035
- 166 Islam, M., Burke, JF Jr, McGowan, TA., Zhu, Y., Dunn SR., McCue P., Kanalas, J., Sharma, K. 2001. Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporin-induced renal dysfunction. *Kidney Int* 59:498-506
- 167 Jiang Z, Schnieder G, van Rooijen N, Liu CC, Kochanek S, Clemens PR. 2004. Sustained muscle expression of dystrophin from a high-capacity adenoviral vector with systemic gene transfer of T cell costimulatory blockade. *Mol Ther* 10:688-696
- 168 Jöbsis GJ, Keizers H, Vreijling JP, de Visser M, Speer MC, Wolterman RA, Baas F, Bolhuis PA. 1996. Type VI collagen mutations in Bethlem myopathy, an autosomal dominant myopathy with contractures. *Nat Genet* 14:113-115

- 
- 169 Jones IL, Gockermann A, Busby WH, Camachohubner C, Clemmons DR. 1993. Extracellular matrix contains insulin-like growth-factor binding protein-5 – potentiation of the effects of IGF-I. *J Cell Biol* 121:679-687
- 170 de Jong L, Woltermann RA, Hillarius S, Bolhuis PA. 1987. Collagen synthesis in cultured myoblasts and myotubes from patients with Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 82:271-280
- 171 Kaminski HJ, Al-Hakim M, Leigh RJ, Katirji B, Ruff RL. 1992. Extraocular muscles are spared in advanced Duchenne Dystrophy. *Ann Neurol* 32:586-588
- 172 Kaplan JC, Fontaine B. 2006. Neuromuscular disorders: gene localisation. *Neuromuscul Disord* 16:I-XV
- 173 Karpati G, Djordje A, Arnold D, Gledhill RB, Guttman R, Holland P, Koch PA, Shoubridge E, Spence D, Vanasse M, Warters GV, Abrahamovicz M, Duff C, Worton RG. 1993. Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 34:8-17
- 174 Kerst B, Mennerich D, Schuelke M, Stoltenburg-Didinger G, von Moers A, Gossrau R, van Landeghem FK, Speer A, Braun T, Hübner C. 2000. Heterozygous myogenic factor 6 mutation associated with myopathy and severe course of Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 10:572-577
- 175 Kherif, S., Lafuma, C., Dehaupas, M., Lachkar, S., Fournier, J., Verdière-Sahuqué, M., Fardeau, M., Alameddine, H. 1999. Expression of Matrix Metalloproteinase 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol* 205:158-170
- 176 Kieseier BC, Schneider C, Clements JM, Gearing AJH, Gold R, Toyka KV, Hartung HP. 2001. Expression of specific matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies. *Brain* 124:341-351
- 177 Kikuchi K, Kadono T, Furure M, Tamaki K. 1997. Tissue inhibitor of Metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderms fibroblasts. *J Invest Dermatol* 108:281-284
- 178 Kirschmann C, Kececioglu D, Korinthenberg R, Dittrich S. 2005. Echocardiographic and electrocardiographic findings of cardiomyopathy in Duchenne and Becker-Kiener muscular dystrophies. *Pediatr Cardiol*. 26:66-72



- 
- 179 Klagsbrunn M, Baird A. 1991. A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* 67:229-231
- 180 Knittel, T., Mehde M., Grundmann, A., Saile, B., Scharf, JG., Ramadori, G. 2000. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 113:443-453
- 181 Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. 1987. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organisation of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50:509-517
- 182 Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Müller CR, Lindhöf M, Kaarianen H, de la Chapelle A, Kiuru A, Sanvontaus ML, Gilgenkrantz H, Récan D, Chelly J, Kaplan JC, Covone AE, Archidiacono N, Romeo G, Liechti-Gallati S, Schneider V; Braga S, Moser H, Darras BT, Murphy P, Francke U, Chen D, Morgan G, Denton M, Greenberg CR, van Ommen GJB, Kunkel LM. 1989. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 45:498-506
- 183 Koenig M, Kunkel LM. 1990. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem* 265:4560-4566
- 184 Kolkenbrock H, Orgel D, Hecker-Kia A, Noack W, Ulbrich N. 1991. The complex between a tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) and 72-kDa progelatinase is a metalloproteinase inhibitor. *Eur J Biochem* 198:775-781
- 185 Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D. 1996. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchow Arch* 429:311-322
- 186 Kovacs EJ, DiPietro LA. 1994. Fibrogenic cytokines and connective tissue production *FASEB J* 8:854-861
- 187 Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ. 1997. Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage and blood vessels. *Human Mut* 9:300-315

- 
- 188 Kumar-Singh R, Chamberlain JS. 1996. Encapsidated adenovirus minichromosomes allow delivery and expression of a 14 kb dystrophin cDNA to muscle cells. *Hum Mol Genet*. 5:913-921
- 189 Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Kaczmarek M, Voelker M, Schuppan D. 2006. Matrix-derived serum markers in monitoring liver fibrosis in children with chronic hepatitis B treated with interferon alpha. *World J Gastroenterol* 12:3338-3343
- 190 Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, Edwards DR. 1994. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 269:9352-9360
- 191 Lee JY, Qu-Petersen Z, Cao B, Kimura S, Jankowski R, Cummins J, Usas A, Gates C, Robbins P, Wernig A, Huard J. 2000. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol* 150:1085-1100
- 192 Lee PD, Sladek R, Greenwood CM, Hudson TJ. 2002. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res* 12:292-297
- 193 Lefaucheur JP, Pastoret C, Sebille A. 1995. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat Record* 242:70-76
- 194 Lenk U, Hanke R, Thiele H, Speer A. 1993. Point mutations at the carboxy terminus of the human dystrophin gene: implications for an association with mental retardation in DMD patients. *Hum Mol Genet* 2:1877-1881
- 195 Lenk U, Oexle K, Voit T, Ancker U, Hellner KA, Speer A, Hübner A. 1996. A cysteine 3340 substitution in the dystroglycan-binding domain of dystrophin associated with Duchenne muscular dystrophy, mental retardation and absence of the ERG b-wave. *Hum Mol Genet* 5:973-975
- 196 Lesca G, Demarquay G, Llense S, Streichenberger N, Petiot P, Michel-Calemard L, Récan D, Vial C, Ollagnon-Roman E. 2003. Symptomatic carriers of dystrophinopathy with chromosome X inactivation bias. *Rev Neurol (Paris)* 159:775-780

- 
- 197 Levine BA, Moir AJ, Patchell VB, Perry SV. 1992. Binding sites involved in the interaction of actin with the N-terminal region of dystrophin. *FEBS Lett* 298:44-48
- 198 Li Q, Raza-Ahmad A, MacAulay MA, Lalonde LD, Rowden G, Trethewey E, Dean S. 1992. The relationship of mast cells and their secreted products to the volume of fibrosis in posttransplant hearts. *Transplantation* 53:1047-1051
- 199 Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, Cummins J, Huard J. 2004. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol* 164:1007-1019
- 200 Liang KW, Nishikawa M, Liu F, Sun B, Ye Q, Huang L. 2004. Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA. *Gene Ther* 11:901-908
- 201 Lidov HG, Selig S, Kunkel LM. 1995. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet* 4:329-335
- 202 Lluri G, Langlois GD, McClellan B, Soloway PD, Jaworski DM. 2006. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) regulates neuromuscular junction development via a beta1 integrin-mediated mechanism. *J Neurobiol* 66:1365-1377
- 203 Löhr M, Hummel F, Martus P, Cidlinsky K, Kröger JC, Hahn EG, Oesterling C, Emmrich J, Schuppan D, Liebe S. 1999. Serum levels of extracellular matrix in acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 46:3263-3270
- 204 Lu QL, Mann CJ, Lou F, Bou-Gharios G, Morris GE, Xue SA, Fletcher S, Partridge TA, Wilton SD. 2003. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med*. 2003 9:1009-1014
- 205 Lundberg I, Brengman JM, Engel AG. 1995. Analysis of cytokine expression in muscle in inflammatory myopathies, Duchenne dystrophy, and non-weak controls. *J Neuroimmunology* 63:9-16
- 206 Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NS, Bodrug SE, Burghes AH, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN, Worton RG. 1988 . Frame-

- 
- shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science*. 242:755-759
- 207 Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. 2004. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev.*;(2):CD003725
- 208 Marder K, Keller F, Schuppan D. 1995. Circulating type VI collagen and undulin, in patients with kidney diseases, after kidney transplantation and on hemodialysis. *Clin Nephrol* 44:178-184
- 209 Matsumura K, Zhong D, Saito F, Arai K, Adachi K, Kawai H, Higuchi I, Nishino I, Shimizu T. 2005. Proteolysis of beta-dystroglycan in muscular diseases. *Neuromuscul Disord* 15:336-341
- 210 Matthews PM, Benjamin D, Van Bakel I, Squier MV, Nicholson LV, Sewry C, Barnes PR, Hopkin J, Brown R, Hilton-Jones D, Boyd Y, Karpati G, Brown GK, Craig IW. 1995. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers.. *Neuromuscul Disord*. 5:209-220
- 211 McArdle A, Edwards RHT, Jackson MJ. 1995. How does dystrophin deficiency lead to muscle degeneration? Evidence from mdx mouse. *Neuromuscul Disord* 5/6:445-456
- 212 McCarter GC, Steinhardt RA. 2000. Increased activity of calcium leak channels caused by proteolysis near sarcolemmal ruptures. *J Membr Biol* 176:169-174
- 213 McCawley LJ, Matrisian LM. 2001. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 13:534-540
- 214 McClorey G, Moulton HM, Iversen PL, Fletcher S. 2006. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. *Gene Ther* 13:73-81
- 215 Mellies U, Dohna-Schwake C, Voit T. 2005. Respiratory function assessment and intervention in neuromuscular disorders. *Curr Opin Neurol* 18:543-547
- 216 Mendell JR, Moxley RT, Griggs RC, Brooke MH, Fenichel GM, Miller JP, King W, Signore L, Pandya S, Florence J, Schierbecker J, Robinson J, Kaiser K, Mandel S, Arfken C, Gilder B. 1989. Randomized, double –blind six month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 320:1592-1597

- 
- 217 Mendell JR, Kissel JT, Amato AA, King W, Signore L, Prior TW, Sahenk Z, Benson S, McAndrew PE, Rice R, Nagaraja H, Stephens R, Lantry L, Morris GE, Burghes HM. 1995. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 333:832-838
- 218 Mendell JR, Boué DR, Martin PT. 2006. The congenital muscular dystrophies: recent advances and molecular insights. *Ped Dev Pathol* 9:427-443
- 219 Merle B, Malaval L, Lawler J, Delmas P, Clezardin P. 1997. Decorin inhibits cell attachment to thrombospondin-1 by binding to a KKTR-dependent cell adhesive site present within the N-terminal domain of Thrombospondin-1. *J Cell Biochem* 67:75-83
- 220 Merle B, Durussel L, Delmas PD, Clezardin P. 1999. Decorin inhibits cell migration through a process requiring its glycosaminoglycan side chain. *J Cell Biochem* 75:538-546
- 221 Merlini L, Cicognani A, Malaspina E, Gennari M, Gnudi S, Talim B, Franzoni E. 2003. Early prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 27:222-227
- 222 Mesa LE, Dubrovsky AL, Corderi J, Marco P, Flores D. 1991. Steroids in Duchenne muscular dystrophy--deflazacort trial. *Neuromuscul Disord* 1:261-266
- 223 Milani S, Herbst H, Schuppan D, Hahn EG, Stein H. 1989. In situ hybridization for procollagen types I, III and IV mRNA in normal and fibrotic rat liver: evidence for predominant expression in nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 10:84-92
- 224 Milani S, Herbst H, Schuppan D, Grappone C, Pellegrini G, Pinzani M, Casini A, Calabró A, Ciancio G, Stefanini F, Burroughs AK, Surrenti C. 1994. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol*. 144:528-537
- 225 Miller RG, Sharma KR, Pavlath GK, Gussoni E, Mynhier M, Yu P, Lanctot AM, Greco CM, Steinman L, Blau HM. 1997. Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: The San Francisco Study. *Muscle Nerve* 20:469-478

- 
- 226 von Moers A, Niggemann B, Müller-Pawlowski H, Michael T, Scheffner D. 1995. Häusliche Maskenbeatmung bei Kindern und Jugendlichen mit neuromuskulären Erkrankungen. *Monatsschr Kinderheilk* 143:515-520
- 227 von Moers A, Möller P, Herbst H, Schuppan D, Stoltenburg-Didinger G. 1996. Expression of mRNA of procollagen type I and procollagen type IV and its cellular localisation in spinal muscular atrophy and Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 6(Suppl 1):34
- 228 von Moers A, Danne T, Möller P, Scheffner D. 1997. Serum levels of carboxyterminal propeptide of type I procollagen, aminoterminal propeptide of type III procollagen and laminin P1 in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Paediatr* 86:377-380
- 229 von Moers A, Landeghem FKH, Cohn RD, Baumgarten E, Bürger J, Stoltenburg-Didinger G. 1998. Dystrophinopathy in a boy with Chediak-Higashi syndrome. *Neuromuscul Disord* 8:489-494
- 230 von Moers A, Zwirner A, Reinhold A, Brückmann O, van Landeghem F, Stoltenburg-Didinger G, Schuppan D, Herbst H, Schuelke M. 2005. Increased expression of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathologica* 109:285-293
- 231 Moghadaszadeh B, Albrechtsen R, Guo LT, Zaik M, Kawaguchi N, Borup RH, Kronquist P, Schröder HD, Davies KE, Voit T, Nielsen FC, Engvall E, Wever UM. 2003. Compensation for dystrophin-deficiency: ADAM12 overexpression in skeletal muscle results in increased  $\alpha 7$  Integrin, utrophin and associated glycoproteins. *Hum Mol Genet* 12:2467-2479
- 232 Monaco AP, Neve RL, Coletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM. 1986. Isolation of a candidate cDNA clones for portions of the Duchenne dystrophy gene. *Nature* 323:646-650
- 233 Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Tryggvason K. 2002. Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7414-7419
- 234 Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. 1997. Activation of  $\beta$ -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in  $\beta$ -catenin or APC. *Science* 275:1787-1790

- 
- 235 Mouly V, Aamiri A, Périé S, Mamchaoui K, Barani A, Bigot A, Bouazza B, François V, Furling D, Jacquemin V, Negroni E, Riederer I, Vignaud A, St Guily JL, Butler-Browne GS. 2005. Myoblast transfer therapy: is there any light at the end of the tunnel? *Acta Myol.* 24:128-133
- 236 Müller-Felber W. Diagnostischer Stellenwert entwicklungsabhängig regulierter Proteine in der Myopathologie neuromuskulärer Erkrankungen. Eine immunhistochemische Untersuchung von N-CAM, Vimentin, Desmin und Tenascin. 1993 Habilitationsschrift
- 237 Muntoni F, Gobbi P, Sewry C, Sherratt T, Taylor J, Sandhu SK, Abbs S, Roberts R, Hodgson SV, Bobrow M, et al. 1994. Deletions in the 5' region of dystrophin and resulting phenotypes. *J Med Genet* 31:843-847
- 238 Muntoni F, Wilson L, Marrosu G, Cianchetti C, Mestroni L, Ganau A, Dubowitz V, Sewry C. 1995. A mutation in the dystrophin gene selectively affecting dystrophin expression in the heart. *J Clin Invest* 96:693-699
- 239 Murakami N, McLennan IS, Nonaka I, Koishi K, Baker C, Hammond-Tooke G. 1999. Transforming growth factor-beta2 is elevated in skeletal muscle disorders. *Muscle Nerve* 22:889-898
- 240 Nagase H, Woessner JF. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491-21494
- 241 Nagase H, Visse R, Murphy G. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69:562-573
- 242 Ngyuen HH, Jayasinha V, Xia B, Hoyte K, Martin P. 2002. Overexpression of the cytotoxic T cell GalNAc transferase in skeletal muscle inhibits muscular dystrophy in mdx mice. *Proc Natl Acad Sci* 99:5616-5621
- 243 Nili N, Cheema AN, Giordano FJ, Barolet AW, Babaei S, Hickey, Eskandarian MR, Smeets M, Butany J, Pasterkamp G, Strass BH. 2003. Decorin inhibition of PDGF-stimulated vascular smooth muscle cell function. *Am J Pathol* 163:869-878
- 244 Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Tachikawa M, Toda T, Tsujimoto A, Arahata K, Nishino I. 2003. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 12:595-600

- 
- 245 Oexle K, Zwirner A, Freudenberg K, Kohlschütter A, Speer A. 1997. Examination of muscular telomere lengths casts doubt on replicative aging as cause of progression in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr. Res* 42:226-231
- 246 Oexle K, Kohlschütter A. 2001. Cause of progression in Duchenne muscular dystrophy: Impaired differentiation more probable than replicative age. *Neuropediatrics* 32:123-129
- 247 Ohlendieck K, Matsamura K, Ionasescu V, Towbin JA, Bosch EP, Weinstein SL, Sernett SW, Campbell KP. 1993. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* 43:795-800
- 248 Oliver L, Raulais D, Vigny M. 1992. Acidic fibroblast growth factor (aFGF) in developing normal and dystrophic (mdx) mouse muscles. Distribution in degenerating and regenerating mdx myofibres. *Growth Factors* 7:97-106
- 249 Overall CM, Wrana JL, Sodek J. 1991. Transcriptional and posttranslational regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor  $\beta$ 1 in human fibroblasts: comparison with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* 266:14064-14071
- 250 Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:221-233
- 251 Palmer E, Wilhelm JM, Sherman F. 1979. Phenotype suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics. *Nature* 277:146-148
- 252 Passerini L, Bernasconi P, Baggi F, Confalonieri P, Cozzi F, Corneli F, Mantegazza R. 2002. Fibrogenic cytokines and extent of fibrosis in muscle of dogs with X-linked golden retriever muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 12:828-835
- 253 Pastoret C, Sebille. 1993. Further aspects of muscular dystrophy in mdx mice. *Neuromuscul Disord* 3:471-475
- 254 Pastoret C, Sebille A. 1995. mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci* 129:97-105
- 255 Patridge T. 2002. Myoblast transplantation. *Neuromuscul Disord* 12 Suppl 1:3-6



- 
- 256 Pereira TN, Lewindon PJ, Smith JL, Murphy TL, Lincoln DJ, Shepherd RW, Ramm GA. 2004. Serum markers of hepatic fibrogenesis in cystic fibrosis liver disease. *J Hepatol* 41:576-583
- 257 Peters CA, Freeman MR, Fernandez CA, Shepard J, Wiederschain DG, Moses MA. 1997. Dysregulated proteolytic balance as the basis of excess extracellular matrix in fibrotic disease. *Am J Physiol* 272:1960-1965
- 258 Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeny HL. 1993. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci* 90:3710-3714
- 259 Pihlajaniemi T, Tryggvason K, Myers JC, Kurkinen M, Lebo R, Cheung MC, Prockop DJ, Boyd CD. 1985. cDNA clones coding for the pro-alpha1(IV) chain of human type IV procollagen reveal an unusual homology of amino acid sequences in two halves of the carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem* 260:7681-7687
- 260 Pillers DM, Bulman DE, Weleber RG, Sigesmund DA, Musarella MA, Powell BR, Murphey WH, Westall C, Panton C, Becker LE, Worton RG, Ray P. 1993. Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electrretinography. *Nat Med* 4:82-86
- 261 Politano L, Nigro G, Nigro V, Piluso G, Papparella S, Paciello O, Comi LI. 2003. Gentamycin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol*;22:15-21
- 262 Porter JD, Merriam AP, Leahy P, Gong B, Feuerman J, Cheng G, Khanna S. 2004. Temporal gene expression profiling of dystrophin-deficient (MDX) mouse diaphragm identifies conserved and muscle group-specific mechanisms in the pathogenesis of muscular dystrophy. *Human Mol Genet* 13:257-269
- 263 Prella A, Medori R, Moggio M, Chan HW, Gallanti A, Scarlato G, Bonilla E. 1992. Dystrophin deficiency in a case of congenital myopathy. *J Neurol* 239:76-78
- 264 Rafael JA, Tinsley JM, Potter AC, Deconinck AE, Davies KE. 1998. Skeletal muscle specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet* 19:79-82

- 
- 265 Rafael JA, Townsend ER, Squire SE, Potter AC, Chamberlain JS, Davies KE. 2000. Dystrophin and utrophin influence fiber type composition and post-synaptic membrane structure. *Hum Mol Genet* 9:1357-1367
- 266 Rahkonen OP, Koskivirta IMO, Oksjoki SM, Jokinen E, Vuorio EI. 2002. Characterisation of the murine Timp4 gene, localisation within intron 5 of the synapsin 2 gene and tissue distribution of the mRNA. *Biochim Biophys Acta* 1577:45-52
- 267 Ram M, Sherer Y, Shoenfeld Y. 2006. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *J Clin Immunol* 26:299-307
- 268 Rampoldi E, Meola G, Fuhrman Conti A, Velicogna M, Larizza L. 1986. A comparative analysis of collagen III,IV, laminin and fibronectin in Duchenne muscular dystrophy and cell cultures. *Eur J Cell Biol* 42:27-34
- 269 Rando TA. 2001. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24:1575-1594
- 270 Reed CC, Iozzo RV. 2002. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J* 19:249-255
- 271 Reitter B. 1995. Deflazacort vs Prednisone in Duchenne dystrophy: trends of an ongoing study. *Brain Dev* 17(Suppl):39-43
- 272 Renwick PJ, Trussler J, Ostad-Saffari E, Fassihi H, Black C, Braude P, Ogilvie CM, Abbs S. 2006. Proof of principle and first cases using preimplantation genetic haplotyping--a paradigm shift for embryo diagnosis. *Reprod Biomed Online*. 13:110-119
- 273 Rezniczek GA, Pereda JM, Reipert S, Wiche G. 1998. Linking integrin  $\alpha 6\beta 4$ -based cell adhesion to the intermediate filament cytoskeleton: direct interaction between the  $\beta 4$  subunit and plectin at multiple molecular sites. *J Cell Biol* 141:209-225
- 274 Rideau Y, Glorion B, Delaubier A, Tarle O, Bach J. 1984. The treatment of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy. *Musc Nerv* 7:281-286

- 
- 275 Rideau Y, Duport G, Gayet LE, Irani Renandel A, Delaubier A, Guillou C. 1993. Early treatment of Duchenne muscular dystrophy: evidence of effectiveness. *Acta Cardiomyologica* 2:191-210
- 276 Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR. 1993. Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 16:536-538
- 277 Rodemann HP, Bayreuther K. 1984. Abnormal collagen metabolism in cultured skin fibroblasts from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci* 81:5130-5134
- 278 Rodillo EB, Fernandez-Bermejo E, Heckmatt JZ, Dubowitz V. 1988. Prevention of rapidly progressive scoliosis in Duchenne muscular dystrophy by prolongation of walking with orthoses. *J Child Neurol* 3:269-274
- 279 Romero NB, Récan D, Rigal O, Leturcq F, Llense S, Barbot JC, Deburgrave N, Cheval MA, Deniau F, Kaplan JC. 1997. A point mutation in the glycerol kinase gene associated with a deletion in the dystrophin gene in a familial X-linked muscular dystrophy: non-contiguous gene syndrome involving Becker muscular dystrophy and glycerol kinase loci. *Neuromuscul Disord.* 7:499-504
- 280 Ropers T, Kroll W, Becka M, Voelker M, Burchardt ER, Schuppan D, Gehrman M. 2000. Enzyme immunoassay for the measurement of human tenascin-C on the Bayer Immuno 1 analyzer. *Clin Biochem* 33:7-13
- 281 Rosales C, O'Brien V, Kornberg L, Juliano R. 1995. Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim Biophys Acta* 1242:77-98
- 282 Saggese G, Bertelloni S, Baroncelli GI, Di Nero G. 1992. Serum levels of carboxyterminal propeptide of type I procollagen in healthy children from the first year of life to adulthood and in metabolic bone disease. *Eur J Pediatr* 151:764-768
- 283 Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, Mognol P, Thibaud JL, Galvez BG, Barthélémy I, Perani L, Mantero S, Guttinger M, Pansarasa O, Rinaldi C, Cusella De Angelis MG, Torrente Y, Bordignon C, Bottinelli R, Cossu G. 2006. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 444:574-579

- 
- 284 Schuppan D, Rühmann T, Hahn EG. 1985. Radioimmunoassay for human type VI collagen and its application to tissue and body fluids. *Anal Biochem* 149:238-247
- 285 Schuppan D, Dumont JM, Kim KY, Hennings G, Hahn EG. 1986. Serum concentration of aminoterminal procollagen type III peptide in the rat reflects early formation of connective tissue in experimental liver fibrosis. *J Hepatol* 3:27-37
- 286 Schuppan D, Somasundaram R, Dietrich W, Ehnis T, Bauer M. 1994. The extracellular matrix in cellular proliferation and differentiation, *Ann NY Acad Sci* 733:87-102
- 287 Schuppan D, Stölzel U, Oesterling C, Somasundaram R. 1995. Serum essays for liver fibrosis. *J Hepatol* 22 Suppl 2:82-88
- 288 Seiler G, Welle M, Busato A, Lin S, Gaschen FP. 2001. Mast cell proliferation and alterations in bFGF amount and localization are involved in the response of muscle to dystrophin deficiency in hypertrophic feline dystrophy. *Neuromuscul Disord* 11:56-71
- 289 Shahin M, Schuppan D, Waldheer R, Ristelli J, Ristelli L, Savolainen ER, Österling CMD, Rahman HMA, El Sahly AM, Razek SMA, Ruby OE, Koch A, Seitz HK. 1992. Serum procollagen peptides and collagen type VI for the assessment of activity and degree of hepatic fibrosis in schistosomiasis and alcoholic liver disease. *Hepatology* 15:637-644
- 290 Sharma AK, Mauer SM, Kim Y, Michael AF. 1995. Altered expression of matrix metalloproteinase-2, TIMP-1 and TIMP-2 in obstructive nephropathy. *J Lab Clin Med* 125:754-761
- 291 Sharma KR, Mynhier MA, Miller RG. 1993. Cyclosporin increases muscular force generation in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 43:527-532
- 292 Slater M. 1996. Dynamic interactions of the extracellular matrix. *Histol Histopathol* 11:175-180
- 293 Smedsrød B. 1988. Aminoterminal propeptide of type III procollagen is cleared from the circulation by receptor-mediated endocytosis in liver endothelial cells. *Collagen Relat Res* 8:375-388

- 
- 294 Smedsrød B, Melkko J, Riteli L, Risteli J. 1990. Circulating carboxyterminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor of liver endothelial cells. *Biochemistry* 271:345-350
- 295 Smith RA, Sibert JR, Harper PS. 1990. Early development of boys with Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 32:519-527
- 296 Smythe GM, Hodgetts SI, Grounds MD. 2001. Problems and solutions in myoblast transfer therapy. *J Cell Mol Med* 5:33-47
- 297 Somasundaram R, Schuppan D. 1994. Type I, II, III, IV, V, and VI collagens serve as extracellular ligands for the isoforms of platelet-derived factor (AA, BB, and AB). *J Biol Chem*, 271:26884-26891
- 298 Sorva A, Tähtelä R, Risteli J, Risteli L, Laitinen K, Juntunen-Backman K, Sorva R. 1994. Familial high serum concentrations of the carboxyterminal propeptide type I procollagen. *Clin Chem* 40:1591-1593
- 299 Soylemezoglu O, Wild G, Dalley AJ, MacNeil S, Milford-Ward A, Brown CB, el Nahas AM. 1997. Urinary and serum type III collagen: markers of renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 12:1883-1889
- 300 Spencer MJ, Tidball JG. 2001. Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? *Neuromuscul Disord* 11:556-564
- 301 Spencer MJ, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K, Tidball JG. 2001. Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin Immunol* 98:235-243
- 302 Stamenkovic I. 2003. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200:448-464
- 303 Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panetieri RA, Petrof B, Narusawa M, Leferovich JM, Sladky JT, Kelly AM. 1991. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352:536-539
- 304 Stephens HR, Duance VC, Dubowitz V. 1980. Biosynthesis of collagen and non-collagen proteins in skin fibroblasts from patients suffering from muscular dystrophy. *Eur J Biochem* 22:558

- 
- 305 Stephens HR, Duance VC, Dunn MJ, Bailey AJ, Dubowitz V. 1982. Collagen types in neuromuscular diseases. *Ann Neurol Sci* 53:45-62
- 306 Sternlicht MD, Lochter A, Sympson CJ, Huey B, Rougler JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ, Werb Z. 1999. The stromal proteinase MMP-3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 98:137-146
- 307 Straub V, Cambell KP. 1997. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol* 10:168-175
- 308 Stuhmann M, Heilbronner H, Reis A, Wegner RD, Fischer P, Schmidtke J. 1991. Characterisation of a Xp21 microdeletion syndrome in a 2-year-old boy with muscular dystrophy, glycerol kinase deficiency and adrenal hypoplasia congenita. *Hum Genet.* 86:414-415
- 309 Sun GL, Zhao S, Li P, Jiang HK. 2006. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in progression muscular dystrophy. *Neurosci Bull* 22:85-90
- 310 Sunohara N, Arahata K, Hoffman EP, Yamada H, Nishimiya J, Arikawa E, Kaido M, Nonaka I, Sugita H. 1990. Quadriceps Myopathy. Forme fruste of Becker muscular dystrophy. *Ann Neurol* 28:634-639
- 311 Sussman M. 2002. Duchenne muscular dystrophy. *J Am Acad Orthop Surg* 10:138-151
- 312 Swiderski RE, Dencoff JE, Floerchinger CS, Shapiro SD, Hunninghake GW. 1998. Differential expression of extracellular matrix remodeling genes in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 152:821-828
- 313 Talts JF, Andac Z, Göhring W, Brancaccio A, Timpl R. 1999. Binding of the G domains of laminins  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  chains and perlecan to heparin, sulfatides,  $\alpha$ -dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J* 18:863-870
- 314 Thiesen S, Rosenquist T. 1995. Expression of collagens and decorin during aortic arch artery development: implications for matrix pattern formation. *Matrix Biol* 14: 573-582
- 315 Tinsley JM, Blake DJ, Roche A, Fairbrother U, Riss J, Byth BC, Knight AE, Kendrick-Jones J, Suthers GK, Love DR, Davies KE. 1992. Primary structure of dystrophin related protein. *Nat* 360:591-593

- 
- 316 Tinsley JM, Deconninck N, Fisher R, Kahn D, Phelps S, Gillis JM, Davies K. 1998. Expression of full length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* 4:1441-1444
- 317 Tomé FMS, Evangelista T, Leclerc A, Sunada Y, Manole E, Estournet B, Barois A, Campbell KP, Fardeau M. 1994. Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *C R Acad Sci Paris* 317:351-357
- 318 Towbin J, Hejtmancik J, Brink P, Gelb B, Zhu X, Chamberlain J, McCabe E, Swift M. 1993. X-linked dilated cardiomyopathy: molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 87:1854-1865
- 319 Trivedi P, Hindmarsh P, Risteli J, Risteli L, Mowat AP, Brook CDG. 1989. Growth velocity, growth hormone therapy and serum concentrations of the amino-terminal propeptide of the type III procollagen. *J Pediatr* 114:225-230
- 320 Troeberg L, Tanaka M, Wait R, Shi YE, Brew K, Nagase H. 2002. E. coli expression of TIMP-4 and comparative kinetic studies with TIMP-1 and TIMP-2: insights into interactions of TIMPs and matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A). *Biochemistry* 41:15025-15035
- 321 Tryggvason K. 1993. The laminin family. *Curr Opin Cell Biol* 5:877-882
- 322 Vachon PH, Xu H, Liu L, Loechel F, Hayashi Y, Arahata K, Reed JC, Wewer UM, Engvall E. 1997. Integrins ( $\alpha7\beta1$ ) in muscle function and survival. *J Clin Invest* 100:1870-1881
- 323 Valentine BA, Cooper BJ, De La Hunta A, O'Quinn R, Blue JT. 1988. Canine X-linked muscular dystrophy; an animal model of Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 88:69-81
- 324 Van der Rest M, Garrone R. 1991. Collagen family of proteins. *FASEB J* 5:2814-2823
- 325 Van der Ven P, Jap P, ter Laak H, Nonaka I, Barth P, Sengers R, Stadhouders A, Ramaekers F. 1995. Immunophenotype of congenital myopathies: disorganization of sarcomeric, cytoskeletal and extracellular matrix proteins. *J Neurol Sci* 129:199-213

- 
- 326 Vanegas OC, Bertini E, Zhang RZ, Petrini S, Minosse C, Sabatelli P, Giusti B, Chu ML, Pepe G. 2001. Ullrich sleratonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *PNAS* 98:7516-7521
- 327 Vleming LJ, Baelde JJ, Westendorp RGJ, Daha MR, Van Es LA, Bruijn JA. 1995. Progression of chronic renal disease in humans is associated with deposition of basement membrane components and decorin in the interstitial extracellular matrix. *Clin Nephrol* 44:211-219
- 328 Vu TH, Werb Z. 2000. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 14:2123-2133
- 329 Wagner KR, Hamed S, Hadley DW, Gropman AL, Burstein AH, Escolar DM, Hoffman EP, Fischbeck KH. 2001. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* 49:706-711
- 330 Watkins SC, Hoffman EP, Slayter HS, Kunkel LM. 1988. Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres. *Nature* 333:863-866
- 331 Webster C, Blau HM. 1990. Accelerated age-related decline in replicative lifespan of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat Cell Mol Genet.* 16:557-565
- 332 Wehling-Henricks M, Lee JJ, Tidball JG. 2004. Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 14:483-490
- 333 Weiss C, Jakubiczka S, Huebner A, Klopocki E, Kress W, Voit T, Hübner C, Schuelke M. 2007. Tandem duplication of DMD exon 18 associated with epilepsy, macroglossia, and endocrinologic abnormalities. *Muscle Nerve* 35:396-401
- 334 Welch EM, Barton ER, Zhou J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrick P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL. 2007. PTC124 targets genetic disorders caused nonsense mutations. *Nature* 447:42-43



- 
- 335 Winder SJ, Knight AE, Kendrick Jones J. Proteinstructure. In: Brown SC, Lucy JA (eds). Dystrophin: Gene, protein and cell biology. Cambridge University Press 1997:27-55
- 336 Woessner JF, Nagase H. Matrix metalloproteinases and TIMPs, Vol. 1 ed: NY, Oxford University Press, 2000
- 337 Xu H, Wu XR, Wewer UM, Engvall E. 1994. Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin  $\alpha 2$  (LAMA2) gene. *Nat Genet* 8:297-302
- 338 Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. 1990. Negative regulation of transforming growth factor beta by the proteoglykan decorin. *Nature* 346:281-284
- 339 Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, Miyazono K, Yamada A, Kanazawa I, Kawai M. 1994. Expression of transforming growth factor- beta 1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. *Am J Pathol* 144/2:221-226
- 340 Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R, Edwards DR. 1998. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci* 21:75-80
- 341 Yoshida M, Ozawa E. 1990. Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem Tokyo* 108:748-752
- 342 Yu Q, Stamenkovic I. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14:163-176
- 343 Yue Y, Li Z, Harper SQ, Davisson RL, Chamberlain JS, Duan D. 2003. Microdystrophin gene therapy of cardiomyopathy restores dystrophin-glycoprotein complex and improves sarcolemma integrity in the mdx mouse heart. *Circulation* 108:1626-1632
- 344 Zanotti S, Saredi S, Ruggieri A, Fabbri M, Blasevich F, Romaggi S, Morandi L, Mora M. 2007. Altered extracellular matrix transcript expression and protein modulation in primary Duchenne muscular dystrophy myotubes. *Matrix Biol* 27; [Epub ahead of print]

- 
- 345 Zentella A, Massagué J. 1992. Transforming growth factor beta induces myoblast differentiation in the presence of mitogens. *Proc Natl Acad Sci* 89:5176-5180
- 346 Zhou L, Porter JD, Cheng G, Gong B, Hatala DA, Merriam AP, Zhou X, Rafael JA, Kaminski HJ. 2006. Temporal and spatial mRNA expression patterns of TGF-beta1, 2, 3 and TbetaRI, II, III in skeletal muscles of mdx mice. *Neuromuscul Disord* 16:32-38
- 347 Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G, Burghes AH, Belfall B, Klamut HJ, Talbot J, Hodges RS, Ray PN, Worton RG. 1988. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 333:466-469

## 8 Danksagung

Die Patienten und ihre Familien haben diese Untersuchung durch ihre Zustimmung zur Nutzung der Muskel- und Serumproben für Forschungszwecke ermöglicht.

Zuerst möchte ich Angelika Zwirner und Markus Schuelke für ihren unermüdlichen Einsatz, ihre Anregungen und Diskussionen danken; ohne ihre Unterstützung und ihre profunden Kenntnisse im Labor wäre die Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit kaum möglich gewesen.

Gudrun Hauk hat mit scheinbar grenzenloser Geduld entscheidend dazu beigetragen, das Manuskript druckreif zu machen, vielen Dank.

Bei Christoph Hübner möchte ich mich für seinen Langmut und seine anregende, freundlich-kritische Begleitung der Arbeit bedanken.

Viele andere Menschen haben in ganz unterschiedlicher Weise zum Gelingen dieses Vorhabens beigetragen. Besonderer Dank gilt Gisela Stoltenburg-Didinger, Theo Michael, Astrid Speer, Peter Möller, Anke Reinhold, Olaf Brückmann, Marion Kramer Herrmann Herbst und Detlef Schuppan.

## ERKLÄRUNG

### § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

26.10.2007

.....

Datum

gez. A. v. Moers

.....

Unterschrift