

Aus dem Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen

Abteilung Hirnforschung

Abteilungsleiter: Professor Dr. R. Meyermann

**Regenerationsverhalten humaner  
Skelettmuskulatur bei neurogenen und  
myopathischen Muskelerkrankungen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Sandra Conzelmann

aus

Albstadt

2003

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. A. Bornemann

2. Berichterstatter:

Professor Dr. E. Kaiserling

## Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung.....	1
1.1 Skelettmuskulatur, Struktur und Myogenese.....	1
1.2 Satellitenzellen.....	5
1.2.1 Geschichte der Satellitenzellen.....	5
1.2.2 Morphologie der Satellitenzellen .....	5
1.2.3 Unterschiede zu embryonalen / fetalen Myoblasten .....	7
1.2.4 Satellitenzellmarker .....	8
1.2.5 Satellitenzellen abhängig von Spezies, Muskelfasertyp und Alter .....	10
1.2.6 Rolle der Satellitenzellen unter pathologischen Bedingungen.....	12
1.2.6.1 Regeneration bei myopathischen Erkrankungen.....	18
1.2.6.2 Regeneration bei neurogener Atrophie der Muskelfasern.....	21
1.3 Planung und Ziel dieser Arbeit.....	24
2. Material und Methoden .....	26
2.1 Material.....	26
2.1.1 Muskelbiopsien.....	26
2.1.2 Entnahme, Präparation, Asservierung und Routinediagnostik.....	28
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Kryostatschnitte.....	29
2.2.2 Immunhistochemie .....	29
2.2.2.1 Grundzüge der Immunhistochemie, ABC-Methode.....	29
2.2.2.2 Primärantikörper.....	31
2.2.2.2.1 Anti-N-CAM .....	31
2.2.2.2.2 Anti-MyoD1 .....	31
2.2.2.2.3 Anti-Myogenin .....	31
2.2.2.3 Sekundärantikörper.....	31
2.2.2.4 Verwendete Lösungen .....	31
2.2.2.5 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen .....	33
2.2.3 Histologie .....	35
2.2.3.1 Färbemethode zur Darstellung regenerierter Muskelfasern .....	35
2.2.3.2 Durchführung der HE-Färbung .....	35
2.2.4 Datenerhebung.....	36
2.2.5 Auswertung.....	37
2.2.5.1 Auswertungskonzept und verwendete Software.....	37
2.2.5.2 Häufigkeit markierter Zellen in den immunhistochemischen Färbungen bezogen auf die verschiedenen Diagnosegruppen.....	37
2.2.5.3 Relative Häufigkeit von basophilen Fasern bezogen auf die verschiedenen Diagnosegruppen.....	38
2.2.5.4 Verteilung der gefärbten Zellen auf die Muskelfasern.....	38
2.2.5.5 Vergleich der Werte der einzelnen Biopsien in den Färbungen MyoD1, Myogenin und HE .....	38

3. Ergebnisse.....	39
3.1 Häufigkeit gefärbter Zellen und basophiler Fasern .....	39
3.1.1 Färbung mit einem Antikörper gegen N-CAM .....	40
3.1.2 Färbung mit einem Antikörper gegen MyoD1 .....	41
3.1.3 Färbung mit einem Antikörper gegen Myogenin .....	42
3.1.4 Relative Häufigkeit basophiler Fasern in der HE-Färbung .....	44
3.2 Vergleich der immunhistochemischen Färbungen mit der HE-Färbung.....	46
3.3 Verteilung der gefärbten Zellkerne.....	47
4. Diskussion .....	49
4.1 Häufigkeit Ncam-positiver Satellitenzellen.....	49
4.1.1 Häufigkeit von N-CAM-positiven Zellen in normaler Skelettmuskulatur....	50
4.1.2 Häufigkeit von N-CAM-positiven Zellen in pathologisch veränderter Skelettmuskulatur .....	51
4.1.3 Vergleich von N-CAM-positiven Zellen bei normaler und pathologisch veränderter Skelettmuskulatur.....	51
4.2 Häufigkeit von MyoD1- und Myogenin- positiven Kernen .....	52
4.2.1 Häufigkeit von MyoD1-positiven Kernen unter normalen und pathologischen Bedingungen.....	54
4.2.2 Häufigkeit an Myogenin-positiven Kernen unter normalen und pathologischen Bedingungen.....	57
4.3 Häufigkeit basophiler Fasern.....	59
4.4 Vergleich von N-CAM-, MyoD1-, Myogenin- positiven Zellen und basophilen Fasern unter normalen und pathologischen Bedingungen.....	61
4.5 Verteilung der MyoD1- und Myogenin- positiven Kerne unter normalen und pathologischen Bedingungen.....	64
4.6 Schlussfolgerungen.....	66
5. Zusammenfassung .....	69
6. Literaturverzeichnis .....	71

# 1. Einleitung

## 1.1 Skelettmuskulatur, Struktur und Myogenese

Die Skelettmuskulatur stellt ein Zellsynzytium dar, das aus vielen, parallel zueinander angeordneten, Muskelfasern besteht. Während der Myogenese differenzieren einzelne mesenchymale Zellen myogen, migrieren und fusionieren zu multinukleären Myotuben. Aus diesen Myotuben, mit zunächst zentral liegenden Zellkernen, entwickeln sich die Muskelfasern, mit der charakteristischen peripheren Lage der Myozytenkerne.

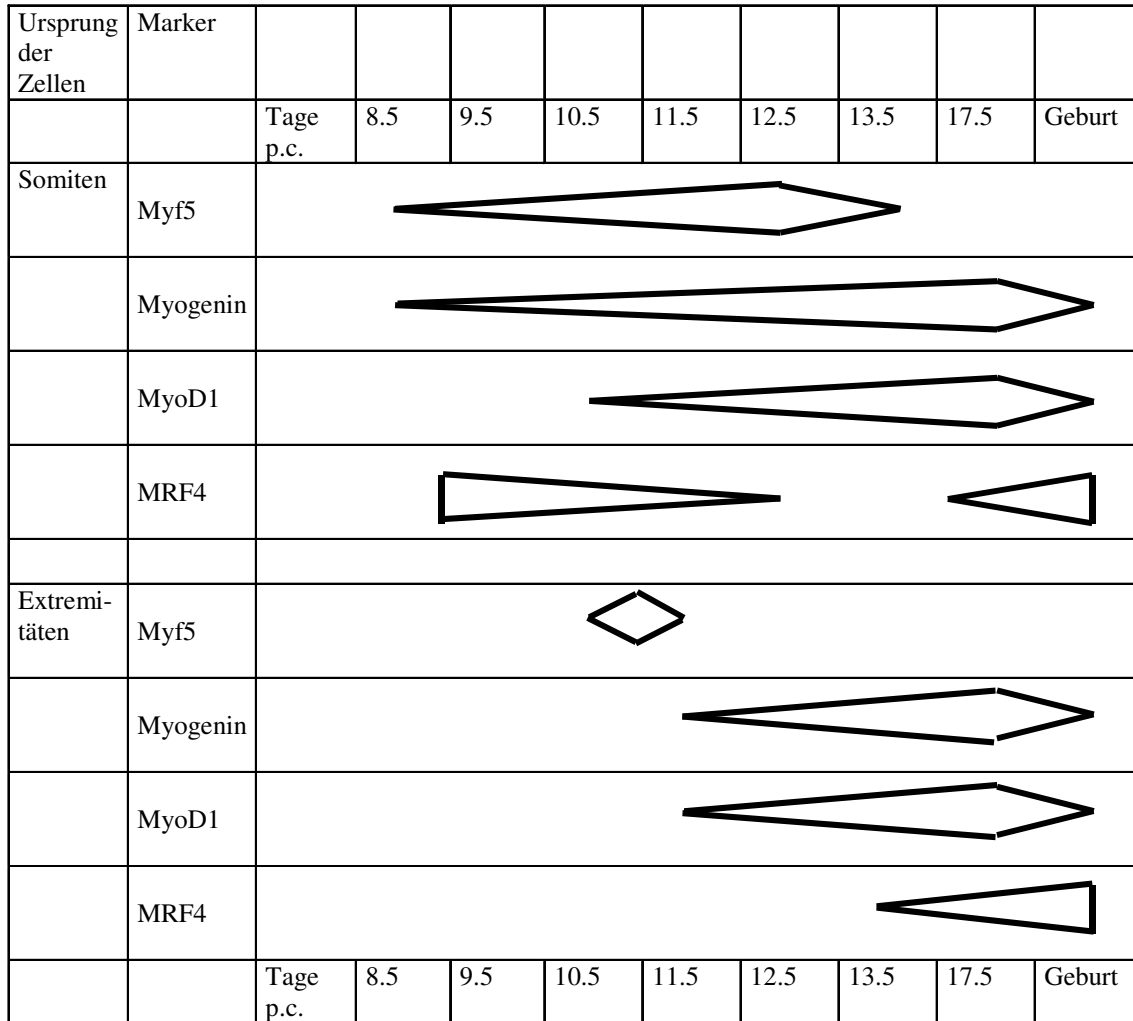
Als Ursprung der Skelettmuskulatur sind die Somiten zu betrachten, diese stellen die ersten metameren Einheiten der Wirbeltiere dar (Chevallier et al., 1977; Christ et al., 1977). Der dorsale Anteil dieser Einheiten wird zum Dermatomyotom, bestehend aus Myotom und Dermatome. Das Myotom ist die Grundlage der autochthonen Rückenmuskulatur. In diesem Stadium wandern mesodermale Einzelzellen aus, welche die Grundlage der Extremitätenmuskeln bilden (Beddington und Martin, 1989).

Entscheidend dafür, dass aus den multipotenten Zellen der Somiten und der in die Extremitäten migrierten Zellen, Zellen mit myogener Differenzierung werden, scheinen die skelettmuskelspezifischen Muskeltranskriptionsfaktoren der MyoD-Familie zu sein. Als erster Regulationsfaktor konnte der Myogenic Determination Factor 1 (MyoD1) nachgewiesen werden. Diesem Faktor wird die Eigenschaft zugewiesen aus Fibroblasten in Kultur, durch Transfektion, stabile Myoblasten zu machen (Davis et al., 1987). Diese Konversionseigenschaft konnte auf andere Zellen, mesodermalen und nicht-mesodermalen Ursprungs, ausgeweitet werden (Weintraub et al., 1989; Choi, 1990). Als nächstes wurde Myogenin isoliert, dieser Transkriptionsfaktor nimmt Einfluss auf den Übergang vom mononukleären Myoblasten zur multinukleären Myotube. Auch für Myogenin konnten Konversionseigenschaften, vergleichbar zu denen von MyoD1, nachgewiesen werden (Wright et al., 1989). Später wurden zwei weitere Mitglieder der MyoD-Familie beschrieben, Myf5 (Braun et al., 1989) und MRF4 (Rhodes und Konieczny, 1989), auch bekannt als Myf6 (Braun et al., 1990) oder Herculim (Miner und Wold, 1990). Das zeitliche und räumliche Auftreten der Muskeltranskriptionsfaktoren wurde, durch In-situ-Hybridisierung an Mäusen, in den

Somiten und Extremitätenmuskeln untersucht (Sassoon, 1993). In den Somiten können Myf 5 und Myogenin als erste Transkriptionsfaktoren 8.5 Tage post coitum (p.c.) nachgewiesen werden (Ott et al., 1991; Sassoon et al., 1989). MRF4 lässt sich zwischen Tag 9. p.c. und 13.5 p.c. darstellen, dagegen tritt MyoD1 erst ab Tag 10 p.c. auf (Sassoon et al., 1989; Bober et al., 1991; Hinterberger et al., 1991). Die Nachweisbarkeit von MRF4 zeigt einen biphasischen Verlauf. Nach dem oben beschriebenen ersten Auftreten, folgt eine Spanne von etwa vier Tagen, in denen sich MRF4 nicht mehr darstellen lässt, bevor er ab Tag 16 p.c. bis zur Geburt wieder nachweisbar wird. MyoD1 und Myogenin sind nach ihrem Auftreten während der ganzen Fetalperiode vorhanden. Bei den Zellen, die in die Extremitäten auswandern, ist das Auftreten der einzelnen Faktoren im Vergleich zu den Somiten different und allgemein verzögert, so tritt als erstes Myf5 ab Tag 10.5 p.c. auf, bevor ab dem 11.5. Tag p.c. MyoD1 und Myogenin nachweisbar sind. MRF4 kann im Somiten als letzter Regulationsfaktor erst ab Tag 13.5 p.c. dargestellt werden (Ott et al., 1991; Sassoon et al., 1989; Bober et al., 1991). MyoD1, Myogenin und MRF4 sind in den Extremitäten bis zum Ende der Fetalperiode darstellbar (Abb. 1.1). Bei allen aufgeführten Untersuchungen wurde eine Beschränkung dieser Muskelregulationsfaktoren der MyoD-Familie auf die Skelettmuskulatur und deren Vorläufer beobachtet.

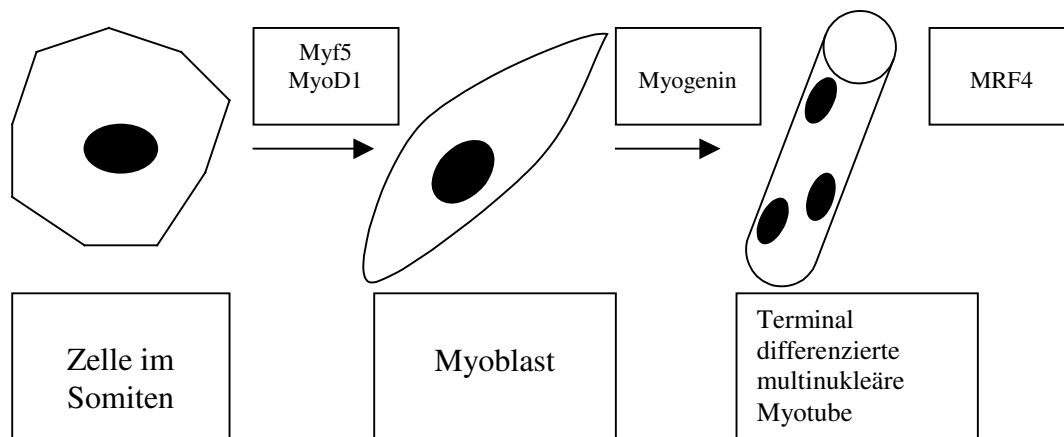
Myoblasten zur Entwicklung der Gliedermuskulatur gehen in mehreren Schüben aus den Somiten hervor und haben spezifische Aufgaben im Aufbau der Muskeln. Sie werden deshalb auch embryonale (frühe) und fetale (späte) Myoblasten genannt. Nach dem Rückzug vom Zellzyklus bilden die Myoblasten mehrkernige Myotuben, welche weiter zu Muskelfasern differenzieren. Durch Erzeugung von Knock-out-Mäusen der Regulationsfaktor kodierenden Gene, konnte gezeigt werden, dass MyoD1 und Myf5 für die myogene Determination der multipotenten Somitenzellen verantwortlich sind und wurden deshalb auch als primäre Muskeltranskriptionsfaktoren bezeichnet. Myogenin und MRF4 tragen, im Sinne sekundärer Transkriptionsfaktoren, zur Differenzierung und zur Beibehaltung des terminale differenzierten Zustandes bei (Megoney und Rudnicki, 1995; Rudnicki und Jaenisch, 1995) (Abb. 1.2).

Verschiedene Untersuchungen geben zudem Hinweise auf eine gezielte Kooperation der verschiedenen Transkriptionsfaktoren. MyoD1 und Myogenin definieren demnach eine andere Linie der myogenetischen Zellreihe, als dies durch die Kooperation der beiden anderen Faktoren, Myf5 und MRF4, der Fall ist (Perry und Rudnicki, 2000).



Nachweis der Muskeltranskriptionsfaktoren der MyoD-Familie, durch in In-situ-Hybridisierung, in den Somiten und in den Extremitäten, zu verschiedenen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung der Maus. Die Darstellung der einzelnen Marker entspricht ihrem groben Verlauf und ist nicht mit den anderen Markern in der Stärke der Expression vergleichbar. Modifiziert nach Sasson, 1993.

ABBILDUNG 1.1



Einfluss der Muskeltranskriptionsfaktoren auf Determination und Differenzierung der myogenen Zelllinie. Modifiziert nach Perry und Rudnicki, 2000.

ABBILDUNG 1.2

Eine andere Population von Zellen mit myogener Differenzierung wird in der späten fetalen Entwicklung dominant, adulte Myoblasten (Feldman und Stockdale, 1992; Hartley et al., 1992). Erst in der späten Embryogenese werden die Muskelfasern durch ein Basalmembran abgegrenzt, damit kann erst zu diesem Zeitpunkt die Lage dieser Zellen zu der Basalmembran beschrieben werden und somit die eindeutige Identifikation als Satellitenzelle erfolgen (Grounds and Yablonka-Reuveni, 1993). Zur Zeit wird diskutiert, ob diese Population tatsächlich schon in der frühen Embryogenese, im Somiten ihren eigenen Ursprung hat (Armand et al., 1983) oder ob sie einem Pool multipotenter Zellen, die ihren Ursprung in vaskulären System hat, zugeordnet werden kann. Diese Möglichkeit wird in Betracht gezogen nachdem Zellkulturen von Zellen aus dem Bereich der dorsalen Aorta embryonaler Mäuse, wie die Satellitenzellen im erwachsenen Muskel, eine Koexpression von endothelialen und muskelspezifischen Markern zeigten (De Angelis et al., 1999). Satellitenzellen unterscheiden sich von anderen Myoblastenpopulationen, wie den fetalen und embryonalen Myoblasten, durch ihre Morphologie, ihre Proteinexpression und ihrem Verhalten in Kultur.



## **1.2 Satellitenzellen**

Muskelfaserkerne sind im normalen adulten Muskel nicht in der Lage in den Zellzyklus zurückzukehren. Somit können diese postmitotischen Zellen in Situationen, die den Aufbau neuer Muskelfasern erfordern, dieser Aufgabe nicht gerecht werden.

### **1.2.1 Geschichte der Satellitenzellen**

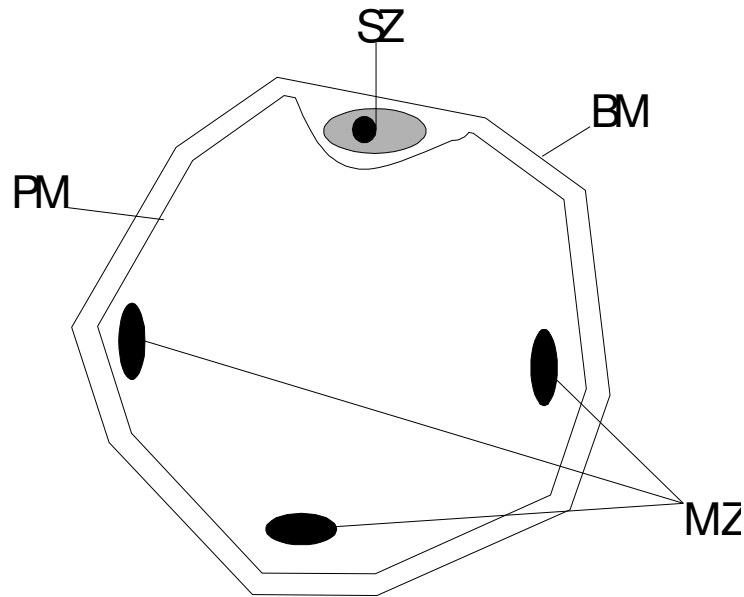
1961 wurde mittels Elektronenmikroskop erstmals ein neuer Zelltyp im erwachsenen Froschmuskel beschrieben. Zuerst wurden bei der Untersuchung von Muskelspindeln einzelne Zellen mit engem Kontakt zu intrafusalen Fasern beschrieben (Katz, 1961). Im gleichen Jahr fand Mauro solche Zellen auch bei extrafusalen Fasern, die er als Satellitenzellen bezeichnete. Er glaubte einen Zusammenhang zwischen diesen Zellen und denen, die nach einer Verletzung auftreten und eine Membran um die Myonuclei aufbauen, zu sehen (Mauro, 1961). Diese Theorie musste er gegen die Auffassung, dass die Kerne während der Regeneration von den verletzten Muskelfasern gebildet werden, verteidigen (Reznik, 1969; Hess und Rosner, 1970; Mastaglia et al., 1975). Mauro (1961) vermutete eine Beziehung zwischen Satellitenzellen und der embryonalen Myogenese, er stellte sie deshalb als ruhende Myoblasten dar, die während der embryonalen Entwicklung nicht in den Fusionsprozess eingingen.

### **1.2.2 Morphologie der Satellitenzellen**

Kennzeichnend für Satellitenzellen ist ihre Lage in einem Spalt zwischen Basal- und Plasmamembran der Muskelfaser (Mauro, 1961) (Abb. 1.3).

Nach dem Eintritt der Satellitenzellen in ein Ruhestadium, verbleiben sie bis zu ihrer Aktivierung in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus (Schultz et al., 1978).

Muir und Mitarbeiter (1965) beschrieben die Zellform der Satellitenzellen als flach und spindelförmig und charakterisierten damit die Form der ruhenden Zellen.



Querschnitt durch eine Muskelfaser

SZ=Satellitenzelle; BM=Basalmembran; PM=Plasmamembran; MZ=Myozytenkerne.

ABBILDUNG 1.3

Erst später wurde in zahlreichen Untersuchungen, die große Variabilität in der Gestalt der Satellitenzellen nachgewiesen. Es wurden an einem oder an beiden Enden der Zellen Ausläufer beschrieben, diese liegen, wie die Zellen an sich, in kleinen Ausbuchtungen der Muskelfasern und zeigen eine Zunahme mit Aktivierung der Zellen (Schmalbruch, 1978; Cull-Candy et al., 1980; Larocque et al., 1980; Herrera und Banner, 1990). Eine starke Ausprägung solcher Ausläufer, mit der vorherrschenden Ausrichtung zum Zentrum der Muskelfasern, konnte vor allem bei Muskeln in der Postnatalperiode beobachtet werden und könnte auf den Fusionsprozess der Satellitenzellen mit der Muskelfaser oder einwandernden Zellen hinweisen (Schultz, 1976; de Maruenda und Franzini-Armstrong, 1978). Elektronenmikroskopische Studien, von unverletzter und verletzter Muskulatur, zeigten einen Zusammenhang der Ausläufer mit der Migrationsaktivität der Zellen. Diese Ausläufer könnten für eine ständige Bewegung, zumindest einiger Satellitenzellen, entlang der Muskelfasern sprechen (Schultz und McCormick, 1994).

Satellitenzellen zeigten im Vergleich zur diffusen Chromatinstruktur der Myozyten ein meist stärker kondensiertes unregelmäßig verteiltes Chromatin, das teilweise an der Kernhülle anhaftet (Moss und Leblond, 1971). Schultz (1976) stellte eine Zunahme dieses kondensierten Chromatins mit dem Alter fest.

### **1.2.3 Unterschiede zu embryonalen / fetalen Myoblasten**

An in Kultur gebrachten embryonalen / fetalen Myoblasten, im Vergleich zu Kulturen postnataler Satellitenzellen, konnten zahlreiche Unterschiede erarbeitet werden. Für Satellitenzellen stellt die Kulturanlage ein Proliferationsreiz dar, sie verlassen ihr Ruhestadium und münden wieder in den Zellzyklus ein. Zuerst wurden Unterschiede während der duplikativen Phase und der anschließenden Fusionsphase untersucht (Cossu et. al, 1980).

Durch die Behandlung mit dem Tumorpromoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) konnte bei embryonalen Myoblasten, dagegen nicht bei Satellitenzellen, die Differenzierung verhindert werden (Cossu et al., 1983 und 1985). Bei diesen Untersuchungen bestätigten sich, die schon 1974 von Hauschka beschriebenen verschiedenen Myotubenformationen, die durch Myoblasten ganz unterschiedlichen Gestationsalters gebildet werden (Cossu et al., 1985).

Während Satellitenzellen zu jedem Zeitpunkt in Kultur eine Expression des Acetylcholinrezeptors zeigen, kann diese bei den embryonalen Myoblasten nur in der Phase der terminalen Differenzierung nachgewiesen werden (Cossu et al., 1987). Die Myotuben, die aus embryonalen und adulten Myoblasten entstehen, zeigen zudem unterschiedliche Muster der Acetylcholinesterase-Expression (Senni et al., 1987). Untersuchungen an Massenkulturen und Klonanalysen ergaben, dass Satellitenzellen später als embryonale Myoblasten zu Myotuben fusionieren und überwiegend größere Klone bilden als die embryonalen Myoblasten (Yablonka-Reuveni et al., 1987). Adulte und embryonale Myoblasten lieferten auch in der Häufigkeit der Desminexpression, in sich teilenden Zellen, verschiedene Ergebnisse (Yablonka-Reuveni und Nameroff, 1990).

Zur Unterscheidung der beiden Myoblastenpopulationen gut geeignet, stellten sich die verschiedenen Expressionsmuster der beiden Myosin Heavy Chain (MHC)-Isoformen heraus. Differenzierte Myozyten und Myotuben der fetalen Myoblasten koexprimieren die embryonale schnelle und die kardiale ventrikuläre Form der MHC. Dagegen kann in Myozyten und Myotuben, die von Satellitenzellen abstammen, initial nur die kardiale ventrikuläre Isoform nachgewiesen werden. Erst später sind auch diese in der Lage das embryonale MHC zu exprimieren (Hartley et al., 1991).

#### **1.2.4 Satellitenzellmarker**

Da Satellitenzellen lange Zeit nur elektronenmikroskopisch, durch ihre Lage von den Myozyten zu unterscheiden waren, mussten Verfahren entwickelt werden, die es ermöglichten Satellitenzellen so darzustellen, dass sie auch lichtmikroskopisch von den normalen Muskelfaserkernen abzugrenzen sind. Immunhistochemische Färbungen stellten sich hierfür als sehr geeignet heraus. Im normalen Muskel lassen sich die Satellitenzellen durch zahlreiche Antikörper, die gegen Proteine verschiedener Genfamilien gerichtet sind, darstellen.

Das Neural cell adhesion molecule (N-CAM) stellt ein Glycoprotein der Zelloberfläche dar, kommt in zahlreichen Isoformen vor und scheint eine wichtige Rolle bei Adhäsionsprozessen innerhalb des Nervensystems zu spielen (Rutishauser, 1984). N-CAM wurde 1985 von Covault und Sanes in mononukleären Zellen des interstitiellen Spalts zwischen den Muskelfasern gefunden. Rieger (1985) stellte eine Konzentration von N-CAM im Bereich der neuromuskulären Endplatten fest. Den Nachweis, dass N-CAM im normalen erwachsenen Menschenmuskel in Satellitenzellen vorkommt, erbrachten Caschman und Mitarbeiter (1987).

Muscle(M)-cadherin ist ein Mitglied der multigenen Familie der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Zelladhäsionsmoleküle, das bei In-vitro-Versuchen, mit Myoblasten der Maus, in den Myotuben gefunden wurde (Donalies et al., 1991). Bei licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen an normalen Rattenmuskeln konnte eine Expression von M-Cadherin durch Satellitenzellen nachgewiesen werden. Dabei stellte sich ein verstärktes Vorkommen von M-cadherin in der Plasmamembran der Satellitenzellen an der Kontaktfläche zur Muskelfaser dar (Bornemann und Schmalbruch, 1994).

Durch die vorherrschende Lokalisation an der Kontaktfläche zwischen der ruhenden Satellitenzelle und der zugehörigen Muskelfaser wurde M-cadherin eine stabilisierende Rolle im Kontakt zwischen Satellitenzelle und Muskelfaser zugesprochen (Irintchev et al., 1994).

Jennische und Mitarbeiter beschrieben 1993 die Expression des Hepatocyte growth factors (HGF) bei in Wachstum oder Regeneration befindlicher Muskulatur. In erwachsener unverletzter Muskulatur ließ sich der Faktor nicht darstellen. HGF hat offensichtlich eine wichtige Funktion bei der Aktivierung ruhender Satellitenzellen, deshalb müsste sein Rezeptor c-met schon auf den ruhenden Zellen vorkommen. Allen und Mitarbeiter (1995) konnten in der RNA von Satellitenzellen erwachsener Ratten, durch Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR), Transkripte des c-met-Rezeptors nachweisen. Das Vorkommen des c-met-Proteins unterhalb der Basalmembran in Zellen, die durch ihre Position als Satellitenzellen zu betrachten sind, wurde von Cornelison und Wold 1997 beschrieben und durch Tatsumi und Mitarbeiter 1998 bestätigt.

Das Vascular cell adhesions molecule 1 (V-CAM1) und der Integrin-Rezeptor Alpha4beta1 sind wichtige Elemente in der Zell-zu-Zell-Interaktion während der myogenen Entwicklung. Deren Vorkommen beschränkt sich in erwachsener Skelettmuskulatur auf die Satellitenzellen, wobei das V-CAM eine Mediatorrolle beim Kontakt zwischen Alpha4beta1-positiven Leukozyten und deren Rezeptor zu spielen scheint (Rosen et al., 1992; Jesse et al., 1998).

Der Nachweis aktivierter Satellitenzellen im Mausmuskel gelang mit den, aus der Myogenese schon bekannten, myogenen basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren, MyoD1 und Myogenin (Grounds et al., 1992). Durch RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass die RNAs von MyoD1, Myf5, MRF4 und Myogenin, spezifische Marker für aktivierte Satellitenzellen darstellen (Smith et al., 1994). Es gab damals keinen Hinweis auf ein Vorkommen von MyoD1 und Myogenin in unverletzter ausgewachsener Muskulatur, jedoch in Myonuclei neu regenerierten Fasern für mindestens zwei Wochen nach deren Fusion (Füchtbauer und Westphal, 1992). Neuere Studien zeigten, dass zumindest Myf5 regelmäßig auch von ruhenden Satellitenzellen in erwachsener Muskulatur exprimiert wird (Kitzmann et al., 1998; Beauchamp et al., 2000). Für MyoD1 und Myogenin gibt es ebenfalls Hinweise, dass

sie auch in unverletzter Muskulatur auf Proteinebene in einem Teil der Satellitenzellen bei der Ratte exprimiert werden (Maier et al., 2002). Die Expression des MyoD1-Proteins wurde in Satellitenzellen des schnell kontrahierenden M. tibialis anterior nachgewiesen (Koishi et al., 1995; Maier et al., 2002). Im langsam kontrahierenden M. soleus konnten dagegen mittels Immunhistochemie keine MyoD1-positiven Zellen dargestellt werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Protein nur in Satellitenzellen von schnell arbeitenden Muskeln vorkommt, die nach einer Verletzung dadurch leichter in den Zellzyklus zurückkehren könnten (Maier et al., 2002). Myogenin zeigte keine Begrenzung auf eine Art von Muskulatur und könnte auf Zellen hindeuten, die ohne vorher zu proliferieren terminal differenzieren, wie es Rantanen und Mitarbeiter 1995 beschrieben (Maier et al., 2002).

Weitere Marker für aktivierte Satellitenzellen stellen die muskelspezifischen Intermediärfilament-Proteine, Desmin und Vimentin dar. Von Desmin wurde zunächst angenommen, dass es nur von terminal differenzierten Myoblasten exprimiert wird (Gard und Lazarides, 1980). In Zellkulturen wurde festgestellt, dass in einigen Spezies wie der Ratte, auch aktivierte Satellitenzellen dieses Protein zeigen, dagegen fehlte Desmin in aktivierten Satellitenzellen von Rindern (Allen et al., 1991). Der Nachweis von Vimentin gelang in Satellitenzellen regenerierender Ratten- und Mäusemuskulatur, in wachsenden oder reifen Muskeln von Ratten, gelang dieser nicht (Bornemann und Schmalbruch, 1992 und 1993; Vater et al., 1994).

Auch Meltrin alpha, ein Mitglied der Metallproteasen-Disintegrin-Familie, konnte in aktivierten Satellitenzellen verletzter Muskulatur nachgewiesen werden und spielt dort eine Rolle im Fusionsprozess der Satellitenzellen untereinander, mit Myotuben oder mit anderen Muskelfasern (Bornemann et al., 2000).

### **1.2.5 Satellitenzellen abhängig von Spezies, Muskelfasertyp und Alter**

Da die Untersuchung von Satellitenzellen überwiegend an tierischen Präparaten erfolgte, ist auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Vergleich zu humaner Muskulatur zu achten. Allgemein gilt dabei, dass die Anzahl der Satellitenzellen, bezogen auf die Anzahl aller subsarkolemmaler Kerne (Satellitenzellen und Myonuclei), weniger von der Spezies als vom Alter des untersuchten Säugetieres abhängt. Dieses

Verhältnis sinkt nach der Geburt von Werten über 30% bei Mäusen und Ratten auf 1-2% ab (Allbrook, 1971). Der schnellste Abfall dieses Verhältnisses, tritt in den ersten Wochen nach der Geburt ein und erfolgt mit zunehmendem Alter langsamer (Schultz, 1974; Snow, 1977). Beim Menschen konnten im Durchschnitt vier Prozent aller intrasarkolemmaler Zellen den Satellitenzellen zugeordnet werden, wobei nur in fünf Prozent der Fälle, der Anteil über acht Prozent lag (Mittelwert plus zwei mal Standardabweichung) (Schmalbruch und Hellhammer, 1976). Diese Beobachtungen beziehen sich v.a. auf Erwachsene, da nur ein Proband jünger als neun Jahre war, dem Alter also, das Cullen und Watkins 1981 für das Erreichen des Erwachsenenniveaus, bezogen auf den Anteil der Satellitenzellen an allen intrasarkolemmaler Zellen, festsetzten. Man glaubte, dass nach der Geburt kein Muskelzuwachs mehr durch Neubildung von Fasern stattfindet. Hypertrophie und Wachstum könnten damit einzig durch die Zunahme des Durchmessers schon vorhandener Muskelfasern erfolgen (Chiakulas und Pauly, 1965; Oertel, 1988). Satellitenzellen stellen durch Teilung während des Wachstums der Muskelfasern neue Myonuclei zur Verfügung. Fusioniert nach deren Teilung über die Hälfte der entstandenen Tochterzellen mit den Muskelfasern, führt dies zu einer Zunahme der Myonuclei bei gleichzeitiger Abnahme der Satellitenzellpopulation (Moss und Leblond, 1971). Die relative Abnahme der Satellitenzellen ist vor allem in oxidativ arbeitender Muskulatur (z.B. dem M. soleus) durch diese Zunahme der Myonuclei zu erklären. Die absolute Anzahl der Satellitenzellen bleibt dabei konstant oder nimmt sogar zu, obwohl ihr relativer Anteil stark rückläufig ist. In glykolytisch oder gemischt arbeitender Muskulatur, wie dem M. extensor digitorum longus (EDL), kann dies nicht die einzige Ursache sein, vielmehr scheint dort auch die Abnahme der absoluten Satellitenzellzahlen eine Rolle zu spielen (Gibson und Schultz, 1983). Das Altern nimmt nicht nur auf den Anteil der Satellitenzellen Einfluss, sondern auch auf das Verhalten der Satellitenzellen in Kultur. Dort beginnen Satellitenzellen älterer Ratten langsamer mit der DNA-Replikation als Zellen jüngerer Ratten, reagieren schwächer auf mitogene Reize und ihre Teilungsrate sinkt (Mezzogiorno et al., 1993; Schultz und Lipton, 1982).

Eine unterschiedliche Verteilung der Satellitenzellen auf verschiedene Muskeltypen wurde von Gibson und Schultz 1982 und 1983 beobachtet. In oxidativ arbeitenden Muskeln wurden deutlich höhere Satellitenzellzahlen, als bei glykolytisch arbeitender

oder gemischter Muskulatur festgestellt. Es wurde eine unterschiedliche Anzahl von Satellitenzellen an Typ I- und Typ II-Fasern in oxidativ und glykolytisch arbeitender Muskulatur gefunden. Während im oxidativ versorgten M. soleus mehr Satellitenzellen an Typ I-Fasern als an Typ IIB-Fasern nachzuweisen waren, stellte sich diese Verteilung beim gemischten EDL umgekehrt dar. Dort stellten sich in absteigender Häufigkeit Satellitenzellen an Typ IIA-, Typ IIB- und Typ I-Fasern dar (Gibson and Schultz, 1982).

### **1.2.6 Rolle der Satellitenzellen unter pathologischen Bedingungen**

Satellitenzellen in erwachsener Muskulatur sind normalerweise ruhend, d.h. nehmen nicht an mitotischen Prozessen teil. Als Antwort auf besondere Bedingungen, wie Verletzung, Hypertrophie oder Denervierung, werden sie wieder aktiv und kehren in den Zellzyklus zurück (Murray und Robbins, 1982a; Murray und Robbins, 1982b; Schultz et al. 1985; Appell et al., 1988; Russell et al., 1992; Rosenblatt et al., 1994; Grounds, 1998). Die genauen molekularen Mechanismen, die zum Wiedereintritt in den Zellzyklus führen, konnten bisher nicht aufgeklärt werden. Verschiedene Studien weisen auf verschiedene Mechanismen, einschließlich Entzündungsvorgänge und Wachstumsfaktoraus Ausschüttung durch das umgebende Gewebe hin (Seale und Rudnicki, 2000). Eine wichtige Rolle im Regenerationsprozess wird den Leukozyten zugeschrieben, da ruhende Satellitenzellen bereits das V-CAM1 und die infiltrierenden Leukozyten den spezifischen Korezeptor VLA-4 tragen (Rosen et al., 1992; Yang et al. 1996; Jesse et al., 1998). Dabei wird eine Zell-zu-Zell-Interaktion, die durch den oben angeführten Rezeptor vermittelt wird, angenommen. Dadurch werden verschiedene Gene in Satellitenzellen und Immunzellen exprimiert, die als Promotoren für die Regeneration fungieren (Jesse et al., 1998). Lymphozyten und Makrophagen wandern wenige Stunden nach einem Muskeltrauma in das Gebiet ein. Makrophagen stellen zu Beginn der Regeneration (48 Stunden nach der Verletzung) sogar die vorherrschende Zellpopulation dar (Orimo et al. 1991; Tidball, 1995). Diese haben verschiedene Aufgaben im Regenerationsprozess, einerseits phagozytieren sie nekrotische Zelltrümmer, andererseits schütten sie vermutlich Wachstumsfaktoren aus, die besondere mitogene Reize auf Myoblasten ausüben (Cantini et al. 1994; Cantini und



Carraro, 1995; Merley et al., 1999). In Abwesenheit von Makrophagen konnte eine deutlich reduzierte Myogenese beobachtet werden, dies deutete weiter auf die Wichtigkeit dieser Zellen hin (Lescaudron et al., 1999).

Die Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Leukaemia inhibitory factor (LIF) stimulieren in Kulturen die Proliferation der Satellitenzellen (Austin et al., 1992). In sich regenerierender Muskulatur konnte ein Anstieg der LIF-Expression schon drei Stunden nach Verletzung beobachtet werden. Dies deutet auf eine Sekretion von LIF noch vor einer Infiltration durch Immunzellen hin. Weitere Untersuchungen zeigten, dass LIF von Myozyten und ortständigen Zellen, nicht muskulären Ursprungs, gebildet werden kann. Das Auftreten von IL-6 wird erst nach 12-24 Stunden nach der Verletzung beschrieben und deutet auf die Sekretion durch infiltrierende Immunzellen hin. Beide Faktoren stellen mutmaßliche Wachstumsfaktoren dar, die in regenerierender Muskulatur die Satellitenzellproliferation anregen (Cantini et al. 1994, Kurek et al., 1996a und 1996b; Seale und Rudnicki, 2000).

Die Injektion von Insulin growth factor-1 (IGF1) in die Muskulatur erwachsener Ratten, führte zu einem erhöhten Gehalt an Muskelprotein und DNA. Dies resultiert aus der Muskelhypertrophie, die als Folge einer Satellitenzellaktivierung zu betrachten ist (Rosenblatt et al., 1994; Adams und Haddad, 1996; Adams und McCue, 1998). Neuere Studien zeigten, dass IGF1 über Aktivierung verschiedener anderer Faktoren, sowohl Einfluss auf Satellitenzellproliferation als auch auf Muskelhypertrophie, während der Regeneration hat (Musaro et al., 1999).

Dem Platelet-derived growth factor und dem basic Fibroblast growth factor werden proliferationsstimulierende Eigenschaften, dagegen dem Transforming growth factor  $\beta$  hemmende Einflüsse zugesprochen (Johnson und Allen, 1995; Husmann et al., 1996).

Der Fibroblast growth factor-6 wird aufgrund der Beobachtung, dass Null-Mutanten-Mäuse dieses Faktors reduzierte Muskelregenerationseigenschaften haben, ebenfalls als Wachstumsfaktor für die Proliferation der Satellitenzellen gehandelt (Floss et al., 1997).

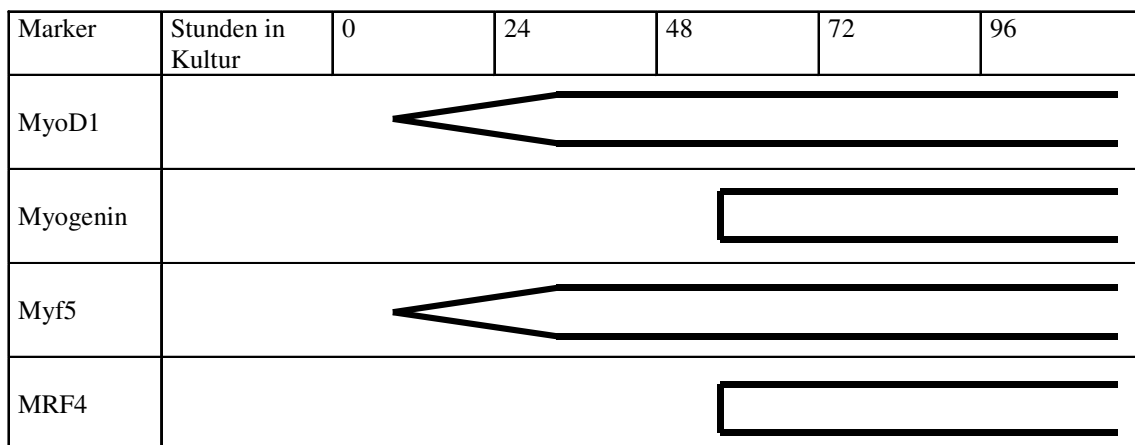
Der eigentliche Stimulus für die Satellitenzellaktivierung in vivo, wurde mit dem HGF vermutlich gefunden. Der HGF ist ein potentes Mitogen und hat auch chemotaktische Eigenschaften auf Satellitenzellen in vitro und in vivo (Allen et al., 1995; Bischoff, 1997; Sheehan und Allen, 1999). Zudem ist c-met, der Rezeptor für den HGF, wie bereits beschrieben, auf ruhenden Satellitenzellen exprimiert (Cornelison und Wold,

1997). Die Expression von HGF ist in regenerierender Muskulatur deutlich erhöht und könnte für die Aktivierung der Satellitenzellen und / oder für die Erweiterung des Satellitenzellpools, noch vor der Bildung neuer Muskelfasern verantwortlich sein. Durch direkte Injektion von rekombinantem HGF wurde eine Aktivierung ruhender ortständiger Satellitenzellen erreicht (Tatsumi et al., 1998). Weiter wurde die Expression des aktivierten c-met auf Satellitenzellen untersucht. Die Aktivierung von c-met scheint für die Proliferation notwendig zu sein. Dagegen bedarf es für die terminale Differenzierung und die Fusion von Myoblasten zu multinukleären Myotuben einer verminderten Expression dieses Rezeptors (Anastasi et al., 1997). Die Herkunft des HGF in regenerierender Skelettmuskulatur bleibt noch offen. Gal-Levi und Mitarbeiter (1998) beschrieben eine unterschiedliche Expression von c-met und dem HGF in wachsenden Myoblasten und Myotuben. Myoblasten exprimieren nur c-met, dagegen neue Myotuben nur den HGF. Die Sekretion von dem HGF durch intakte Myotuben könnte dabei zur Proliferation der Satellitenzellen während der Muskelregeneration beitragen. HGF hat auf Myoblasten in Kultur chemotaktische Eigenschaften (Bischoff, 1997). Dies bedeutet, dass HGF aktivierte Satellitenzellen aus nicht verletzten Bezirken der Muskulatur, chemotaktisch zur Migration in die Regenerationszonen anregen könnte. Diese Wanderung der Satellitenzellen ist schon länger bekannt, wobei der Stimulus noch nicht eindeutig geklärt werden konnte (Schultz et al., 1986 und 1988; Watt et al., 1987; Hughes and Blau, 1990). Andere Autoren beschrieben eine autokrine Schleife der c-met/HGF-Expression durch proliferierende Myoblasten, die dadurch ihre eigene Proliferation fördern könnten (Anastasi et al., 1997). Auch die Möglichkeit, dass bei zerstörter Basalmembran die extrazelluläre Matrix die HGF-Ausschüttung übernimmt, konnte nicht ausgeschlossen werden. Bisher wurde nur für das c-met/HGF-System bewiesen, dass es bei intakter Basalmembran in der Lage ist ruhende Satellitenzellen in den Zellzyklus zurückzuholen (Allen et al., 1995). Mit Rückkehr der Satellitenzellen in den Zellzyklus läuft die Muskelregeneration größtenteils analog zum Aufbau neuer Muskelfasern während der Myogenese ab.

Die Stärke der Regeneration scheint einerseits von der Zahl der überlebenden Satellitenzellen abhängig zu sein und andererseits von der Möglichkeit, dass Satellitenzellen aus entfernten Regionen, auch über die Basalmembran hinweg, in das verletzte Gebiet einwandern können und dort Position an einer Faser beziehen (Lipton

und Schultz, 1979; Watt et al., 1982; Alameddine et al., 1991). Ob es zur Einwanderung von Satellitenzellen kommt ist abhängig von der Art und Größe der Muskelverletzung. Lokal begrenzte Läsionen können mit einer Einwanderung ablaufen, haben aber auch die Möglichkeit ohne deutliche Satellitenzellproliferation und -migration abzuheilen. (Schultz et al. 1985; Hughes und Blau, 1990). Schultz und Mitarbeiter markierten 1985 Satellitenzellen in verletzten Rattenmuskeln und wiesen einen starken Anstieg dieser Zellen 15 bis 20 Stunden nach der Verletzung in den betroffenen Regionen nach. Sie beobachteten gleichzeitig eine Abnahme der Zellen nach 25 Stunden in Regionen proximal der Läsion.

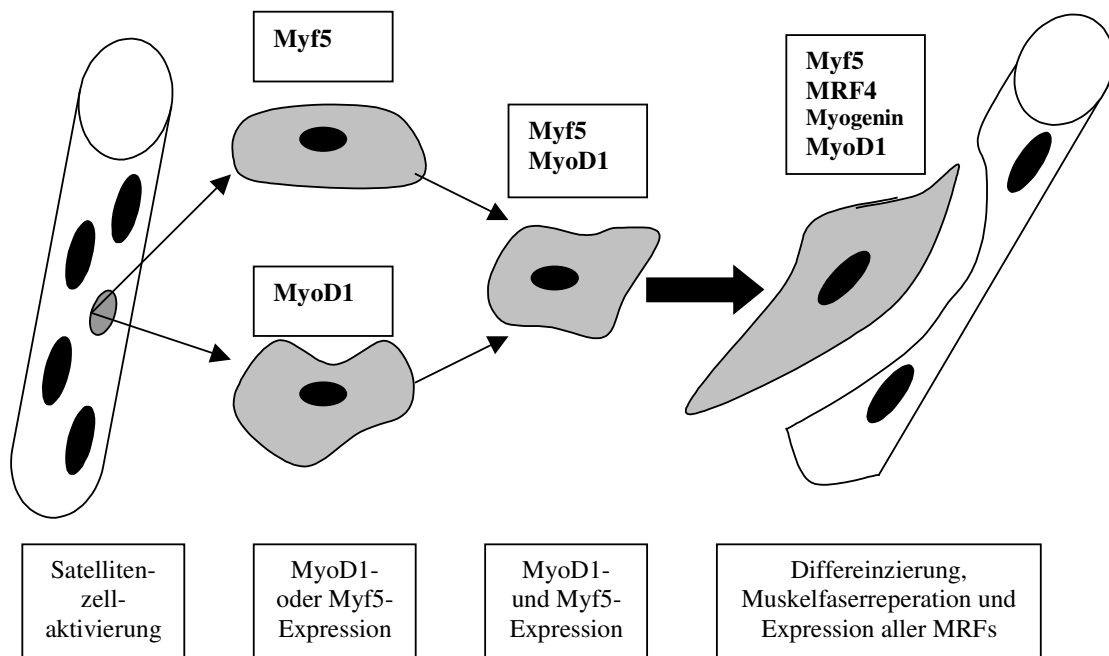
In verschiedenen Studien wurde mittels RT-PCR und Immunhistochemie, an in Kultur gebrachten Satellitenzellen von Ratten und Mäusen, als erster Marker für eine vollzogene Aktivierung MyoD1 gefunden (Smith et al., 1994; Yablonka-Reuveni und Rivera, 1994; Cornelison und Wold, 1997). Der Zeitpunkt des ersten Auftretens wurde durch Smith auf zwölf Stunden nach der Kulturanlage festgesetzt, dagegen verwiesen Cornelison und Wold auf einzelne MyoD1-positive Zellen sofort nach der Kulturanlage. Smith beschrieb das Auftreten von Myf5 und MRF4 nahezu gleichzeitig nach 48 Stunden, wobei Myogenin erst nach 72 Stunden darstellbar war. Heute wird den Beobachtungen von Cornelison und Wold mehr Bedeutung zugemessen, die neben dem gelegentlichen Nachweis von MyoD1 zu Kulturbeginn, auch Myf5 schwach nachweisen konnte (Abb. 1.4).



Nachweis der Muskeltranskriptionsfaktoren der MyoD-Familie, durch RT-PCR und Immunhistochemie, in Kulturen von Satellitenzellen erwachsenen Mäusen, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Kulturanlage. Die Darstellung der einzelnen Marker entspricht ihrem groben Verlauf und ist nicht mit den anderen Markern in der Stärke der Expression vergleichbar. Modifiziert nach Cornelison und Wold 1997.

ABBILDUNG 1.4

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MyoD1- und Myf5-Transkripte, noch vor der ersten Teilung, die erst nach 42 bis 48 Stunden stattfindet, auftreten. Aktivierte Satellitenzellen, exprimieren somit zuerst entweder MyoD1 oder Myf5, bevor sie beide koexprimieren. Der Proliferation folgend treten auch Myogenin- und MRF4-Transkripte auf, diese zeigen den Beginn der Differenzierung und die Fusion zu Myotuben an (Abb. 1.5) (Perry und Rudnicki, 2000). Die Formation erster Myotuben konnte in Kultur schon 96 Stunden nach deren Anlage beobachtet werden (Cornelison und Wold, 1994). Mit der Differenzierung ziehen sich die Satellitenzellen wieder vom Zellzyklus zurück und fusionieren entweder untereinander zu Myotuben oder bauen durch Fusion mit bestehenden Myotuben und Muskelfasern neue Muskelfasern auf.



Einfluss der Muskeltranskriptionsfaktoren der MyoD-Familie auf aktivierter Satellitenzellen. Zuerst werden MyoD1 oder Myf5 exprimiert, anschließend beide und mit der Differenzierung sind auch Myogenin und MRF4 nachweisbar. Schließlich fusionieren diese Zellen entweder untereinander oder mit noch bestehenden Muskelfasern, wie in der Skizze dargestellt. Modifiziert nach Perry und Rudnicki, 2000.

ABBILDUNG 1.5

Inzwischen konnten die Muskeltranskriptionsfaktoren MyoD1, Myogenin und Myf5 auch auf Proteinebene in den Satellitenzellen und Myotuben nachgewiesen werden (Füchtbauer und Westphal, 1992; Koishi et al., 1995; Cooper et al., 1999; Maier et al.; 2002). Das Auftreten von MRF4 auf der Proteinebene scheint dagegen auf neu geformten Myotuben beschränkt zu sein und fehlt in Satellitenzellen (Zhou und Bornemann, 2001).

Schmalbruch beobachtete 1976 vier verschiedene Regenerationsmechanismen, die der Phagozytose nekrotisierter Muskelfasern folgen können: (1) Ersatz verloren gegangener Fasern durch Clusters von Myotuben, die innerhalb noch vorhandener Basalmembranschläuchen, durch Satellitenzellen aufgebaut wurden. Diese Clusters verdrängen das Endomysiums und erscheinen dann in Form von längsgespaltene Fasern (split-fibres). (2) Fusion überlebender Faserfragmente mit Satellitenzellen. (3) Satellitenzellen der überlebenden Fasern proliferieren und fusionieren dann zu Myotuben, die unterhalb der Basalmembran auftreten. (4) Dünne Fasern treten im Interstitium auf, deren Herkunft ist dabei nicht sicher zu bestimmen.

Unter der Vorstellung, dass die erhaltene Basalmembran eine wichtige Rolle bei der Regeneration spielt, wurde der Begriff des „endomysialen Schlauchs“ geprägt. Dieser steht für die strukturelle und räumliche Orientierung der neuen Myotuben und für Reinnervationsvorgänge als Leitstruktur zur Verfügung (Bischoff, 1994). Schon 1970 verwies Aloisi darauf, dass für eine erfolgreiche Regeneration das Überleben der Satellitenzellen gewährleistet sein muss. Dieser Vorgang kann durch erfolgreiche Phagozytosevorgänge beschleunigt werden. Bischoff (1994) beschrieb Phagozytose und Abbau der nekrotisierten Muskelfasern innerhalb des endomysialen Schlauchs, vermittelt durch Phagozytosevorgänge von Makrophagen und verschiedene Proteasen.

Neuere Arbeiten zeigten, dass Satellitenzellen auch ohne vorher zu proliferieren die Möglichkeit haben, muskelspezifische Muskeltranskriptionsfaktoren der MyoD-Familie zu exprimieren und terminal zu differenzieren (Rantanen et al., 1995).

Der Regenerationsprozess wird in besonderem Maße durch die MyoD1-Funktion gesteuert. Seine Expression steht deshalb unter der Kontrolle verschiedener Faktoren. In diesem Zusammenhang sind vor allem verschiedene Fibroblast growth factors (FGFs), die Zyklin-abhängigen Kinasen (Cyclin-dependent kinases = Cdk) und deren Inhibitoren (z.B. p21) von Bedeutung. MyoD1 aktiviert den Cdk-Inhibitor p21, die

Cdks werden konsekutiv weniger exprimiert. Dies bewirkt den Rückzug aus dem Zellzyklus und die terminale Differenzierung der aktivierten Satellitenzellen (Halevy et al. 1995; Skapek et al., 1995). Die FGFs hemmen die Transkription des MyoD1-Genes, wodurch die terminale Differenzierung gehemmt wird (Vaidya et al., 1989). Der phänotypischen Differenzierung folgend, kommt es zur Fusion der Satellitenzellen, entsprechend der Möglichkeiten, die Schmalbruch 1976 beobachtete.

Verschiedene Adhäsionsmoleküle (N-CAM, N-cadherin und M-cadherin), sowie Meltrin alpha (vgl. 1.2.4) sind an diesem Fusionsprozess beteiligt (Dickson et al., 1990; Knudsen et al., 1990; Mège et al., 1992; Yagami-Hiromasa et al., 1995; Zeschnigk et al., 1995; Bornemann et al. 2000).

Im Verlauf der Regeneration ist das Zytoplasma reich an zytoplasmatischer RNA in Form von Ribosomen, was auf eine aktive Proteinsynthese hinweist. Deshalb färbt sich dieses in der Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung blauviolett. Dieses Phänomen wird auch Basophilie genannt. Somit färben sich während der Regeneration und für einige Wochen nach deren Abschluss, regenerierte Muskelfasern in der HE-Färbung basophil an und werden deshalb auch basophile Fasern bezeichnet. Im Gegensatz dazu stehen die rot gefärbten, nicht neu regenerierten, Skelettmuskelfasern (Schmalbruch, 1976). Schmalbruch (1976) zeigte, dass sich regenerierte Muskulatur durch verschiedene histologische Merkmale von unverletzter Muskulatur unterscheidet: zentrale Kerne, splitting fibers, Fibrose und eine erhöhte Variabilität im Muskelfaserdurchmesser. Diese typisch myopathischen Veränderungen wurden zunächst als degenerativ angesehen, Schmalbruch sah darin jedoch regenerative Prozesse.

#### **1.2.6.1 Regeneration bei myopathischen Erkrankungen**

Sowohl bei der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (Duchenne type muscular dystrophy, DMD), als auch bei der Muskeldystrophie vom Typ Becker (Becker type muscular dystrophy, BMD), die einen besseren Verlauf als die DMD zeigt, liegt eine Mutation des Dystrophingenes auf dem kurzen Armes des X-Chromosoms (p21, Kartierungsposition 21) vor und deren Vererbung erfolgt X-chromosomal-rezessiv. Das Genprodukt Dystrophin ist subsarkolemmal in der Muskelfaser lokalisiert und dient wahrscheinlich der Halterung kontraktile Proteine der extrazellulären Matrix. Sein Fehlen, wie es bei der DMD immer auftritt oder sein funktioneller Defekt, der häufig

bei der BMD vorliegt, stellt somit das direkte Korrelat der Krankheit dar. Die DMD tritt bei den betroffenen Knaben schon frühzeitig nach der Geburt auf und führt zu einem derart progressiven Muskelschwund, dass dieser meist schon in den ersten zwei Lebensjahrzehnten lebensdeterminierend ist. Ein klinisches Merkmal ist die „Pseudohypertrophie“ der Waden, damit ist die überdurchschnittliche Zunahme des Wadenumfangs gemeint. Diese kommt durch die ständig ablaufenden Regenerationsvorgänge und den Ersatz von Muskulatur durch Bindegewebe, im Sinne der oben beschriebenen myopathischen Veränderungen, zustande. Unter den anderen Dystrophien, die autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv vererbt werden, sind verschiedene Erkrankungen zusammengefasst, die in der Regel eine günstigere Prognose als die X-chromosomal vererbten, haben.

Die autosomal-dominanten Muskeldystrophien werden nach dem bevorzugtem klinischen Verteilungsmuster bezeichnet, demgegenüber stehen die Bezeichnungen für die autosomal-rezessiven, die sich nach dem Beginn der klinischen Symptomatik und der Primärlokalisation richten (Moll und Bornemann, 2001).

Unter den verschiedenen Muskeldystrophien wurde die DMD, hinsichtlich dem Verlauf der Regenerationsprozesse, am Besten untersucht. Die Erkrankung kann grob in zwei Abschnitte unterteilt werden. Der Erste ist durch umfassende Regeationsvorgänge gekennzeichnet und tritt zu Beginn der Erkrankung auf. Als Folge, der ständig ablaufenden Regeneration, ist der zweite Abschnitt zu betrachten, der Muskel ist mit Fett und Bindegewebe durchsetzt und zeigt damit das Bild einer Endstadienmyopathie.

Um entsprechend weitreichende Untersuchungen durchzuführen, war es notwendig auf tierische Modelle für die DMD auszuweichen. Mdx Mäuse stellen ein solches Modell dar, sie weisen eine Mutation auf, die eine Expression des Dystrophins bei Mäusen verhindert. Dadurch entstehen, vergleichbar zur DMD, bereits kurz nach der Geburt Läsionen, die umfassender Regenerationsvorgänge bedürfen (Coulton et al., 1988). Verschiedene Studien untersuchten die Häufigkeit von Satellitenzellen bei unterschiedlichen Krankheitsgruppen, dabei fanden sie einheitlich erhöhte Satellitenzellzahlen bei der DMD gegenüber normaler Skelettmuskulatur und anderen neuromuskulären Erkrankungen (Wakayama, 1976; Wakayama et al., 1979; Ischimoto et al., 1983; Terasawa, 1986; Watkins and Cullen, 1988; Maier und Bornemann, 1999). Die einzelnen Untersuchungsergebnisse schwankten jedoch stark zwischen den

verschiedenen Autoren. Während Ishimoto die relative Satellitenzahl pro Muskelfaser im Querschnitt mit 0,493 beschrieb, wurde sie von Watkins und Cullen mit 0,119 und Maier und Bornemann mit 0,12 beobachtet. Dagegen stehen die Werte normaler Muskulatur, die zwischen 0,049 und 0,064 für Erwachsene, bzw. 0,102 für Kinder, in den unterschiedlichen Studien schwankten (Ishimoto et al., 1983; Watkins and Cullen, 1988; Maier und Bornemann, 1999). Diese Beobachtungen stehen in scheinbarem Widerspruch zur Tatsache, dass die Regenerationskapazität den stetigen Verlust an Muskelfasern bei der DMD, im Vergleich zu anderen Erkrankungen, nicht aufhalten kann. Dies lässt sich nur durch eine ineffektive Regeneration bei dieser Erkrankung erklären (Wakayama et al., 1979). Satellitenzellen von Patienten mit einer DMD zeigten auch morphologische Unterschiede zu den Satellitenzellen anderer Krankheitsgruppen und gesunder Muskulatur (Watkins and Cullen, 1986 und 1988). Verschiedene Ergebnisse zeigten die Studien hinsichtlich der Kapazität der Satellitenzellen, nachdem sie mehrfach an Replikationsrunden teilnahmen. Zunächst wurde angenommen, dass die Regenerationsantwort mit Dauer der DMD erschöpft, neuere Studien an mdx Mäusen sprechen jedoch dagegen (Webster and Blau, 1990; Bockhold et al., 1998). Ob diese neueren Beobachtungen auf die humane DMD zu übertragen sind, bleibt fraglich. Muskeln von mdx Mäusen weisen auch in späten Krankheitsstadien kaum fibrotische Bezirke auf, dadurch bleibt deren Muskelkraft weitgehend erhalten und stellt damit einen grundlegenden Unterschied zur Muskulatur bei der DMD dar (Di Mario et al., 1991).

Trotz der vielen Untersuchungen an Muskulatur von DMD-Patienten und mdx Mäusen, ist dem Auftreten der Muskeltranskriptionsfaktoren der MyoD-Familie in diesen Muskeln nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt worden. Bhagwatti und Mitarbeiter stellten 1996 durch In-situ-Hybridisierung Hypothesen auf, die semiquantitative Aussagen hinsichtlich der Expression der MRFs bei mdx Mäusen darstellen. Die mRNA von MyoD1 wurde in Satellitenzellen und jungen Myotuben gefunden, die mRNAs von Myogenin, Myf5 und MRF4 wurden dagegen schwächer exprimiert und konnten allgemein in weniger Zellen nachgewiesen werden (Bhagwati et al., 1996). Diese Ergebnisse wurden jedoch nicht mit anderen dystrophen Modellen verglichen, sondern stellten eine Bestätigung der vorne beschriebenen allgemeingültigen Phasen der Muskelregeneration dar. Sie zeigten darüber hinaus das Vorkommen der mRNAs aller



Muskeltranskriptionsfaktoren der MyoD-Familie in aktivierten Satellitenzellen und in jungen Myotuben. Bei anderen Erkrankungen aus dem Formenkreis der Dystrophien, die häufig auch als non-DMD Muskeldystrophien bezeichnet werden, konnten im Vergleich zu normaler Muskulatur, keine erhöhten Werte bezüglich der relativen Satellitenzellzahl festgestellt werden (Terasawa, 1986; Maier und Bornemann, 1999).

#### **1.2.6.2 Regeneration bei neurogener Atrophie der Muskelfasern**

Unter dem Begriff der neurogenen Muskelatrophie werden verschiedene Erkrankungen, mit Läsion des zweiten Motoneurons zusammengefasst. Sie beschreiben die direkten Folgen der Denervierung auf die Muskelfasern. Im Erwachsenenalter hat diese Gruppe unter den neuromuskulären Erkrankungen den größten Anteil. Die Ursache der Denervierung kann spinal (im Vorderhornmotoneuron) oder bulbär (in den Hirnnervenkernen), radikulär oder distal im Nerv selbst bestehen. Dabei kann zwischen angeborenen und erworbenen Störungen unterschieden werden. Beispiele für angeborene Erkrankungen aus dieser Gruppe sind die infantile spinale Muskelatrophie Werdnig-Hoffmann, mit Degeneration des Motoneurons auf Rückenmarksebene und die amyotrophe Lateralsklerose (ALS), mit Untergang sowohl des ersten als auch des zweiten Motoneurons. Erworbene Störungen können als Folge systemischer Erkrankungen, z.B. aus dem Kreis der endokrinen oder autoimmunen Erkrankungen (Diabetes mellitus, Vaskulitiden, Amyloidose), im Sinne sekundärer Neuropathien auftreten (Moll und Bornemann., 2001).

Bei den Folgen der Denervierung auf die Muskulatur, muss zwischen Kurzzeit-Denervierung und Langzeit-Denervierung unterschieden werden. Während sich bei Kurzzeit-Denervierung eine Zunahme der Satellitenzellen einstellt, kommt es bei der Langzeit-Denervierung zu einem Abfall der relativen Satellitenzellzahlen (Viguie et al., 1997). Nach Denervierung zeigte sich bei Ratten für zwei Monate ein Anstieg der Satellitenzellen, nach vier Monaten war dieser bereits wieder rückläufig, jedoch gegenüber der Kontrolle noch erhöht. Sieben Monate nach Denervierung lag der Wert deutlich unter dem Wert nicht-denervierter Muskulatur.

Murray und Robbins beschrieben in zwei verschiedenen Studien 1982, die proliferierenden Zellen, die sich in der Muskulatur in den ersten Wochen nach der Denervierung darstellen lassen. Sie stellten einen deutlichen Anstieg der Inkorporation

von [3H]Thymidin in die DNA, was einen Anstieg der mitogenen Aktivität anzeigt, fest. Der Anstieg stellte sich nach 36 Stunden mit einem Maximum nach vier Tagen ein, bevor der Wert nach sieben Tagen wieder auf den Ausgangswert abfiel (Murray und Robbins, 1982a). Sie typisierten die Zellen, die für diesen Proliferationszuwachs verantwortlich waren. Die Population setzte sich nach einer Woche aus Zellen ganz verschiedener Zellgruppen wie Fibroblasten, Makrophagen, perineuralen Zellen, vaskulären Zellen und Satellitenzellen zusammen, die letzteren machten dabei nur etwa zehn Prozent aus (Murray und Robbins, 1982b).

Der reine Satellitenzellzuwachs wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt beschrieben, bei der Maus lag er bei 30 Tagen nach der Denervierung, dagegen wurde er bei Ratten in den ersten 70 Tagen überhaupt nicht beobachtet (Schmalbruch und Lewis, 1994; Snow, 1983).

Der Verlust an Satellitenzellen, trotz deren Aktivierung, wurde unter anderem versucht mit dem Ablösen der Satellitenzellen von ihren Fasern und deren anschließender Abwanderung zu erklären (Ontell, 1975; Lu et al., 1997). Bei der Ratte wurde der Verlauf der relativen Anzahl an Satellitenzellen kontinuierlich untersucht. Dabei wurde ein Anstieg dieser Anzahl im EDL von 2,8% auf 9,1% nach zweimonatiger Denervierung beobachtet, bevor ein Abfall bis auf 1,1% nach 18 Monaten erfolgte (Viguie et al., 1997). Rodrigues und Schmalbruch (1995) beschrieben sogar einen Abfall des Anteils an Satellitenzellen auf ein Fünftel im Vergleich zu normaler Muskulatur nach 20-30 Wochen.

Mit der Dauer der Denervierung ist auch die Empfindlichkeit der Satellitenzellen auf Proliferationsstimuli, die bei normalen Zellen anschlagen, rückläufig (Billington, 1996). Zudem scheint allgemein die terminale Differenzierung der aktivierten Satellitenzellen und die anschließende Ausreifung der Myotuben auszubleiben (Gulati, 1988).

Im Gegensatz zu den myopathischen Veränderungen wurde in mehreren Studien das räumliche und zeitliche Auftreten der Muskeltranskriptionsfaktoren der MyoD-Familie genau untersucht. In diesen Studien konnte offen gelegt werden, dass durch die Denervierung die Transkription dieser Faktoren angeregt wird (Buonanno et al., 1992; Voytik et al., 1993; Adams et al., 1995). Buonanno stellte dabei eine Zunahme der mRNAs von MRF4, MyoD1 und Myogenin 8 Stunden nach Denervierung fest, dagegen steigt die mRNA von Myf5 erst nach zwei Tagen an. Auch die maximale Zunahme der

einzelnen Faktoren war dabei verschieden, während Myogenin und MyoD1 um ein Vielfaches erhöht nachweisbar waren, kam es nur zu einem moderaten Anstieg von Myf5 und MRF4. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass eine von außen angelegte elektrische Aktivität, auch in Abwesenheit eines intakten Nervs, die verstärkte Expression der Muskeltranskriptionsfaktoren der MyoD-Familie verhindern kann (Buonanno et al., 1992). In der Studie von Adams (1995) wurde die Dauer der Gen-Expression bei Langzeit-Denervierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression der RNAs von Myf5 und MyoD1 für mindestens sieben Monate erhöht bleibt, während diese für MRF4 und Myogenin nicht länger als ein Monat anhält. Eine weitere Differenzierung dieser Ergebnisse wurde durch die Unterscheidung zwischen schnellen und langsamen Muskelfasern erreicht. Myogenin war dabei vor allem in schnellen Muskelfasern erhöht und MyoD1 in langsamen (Voytik et al., 1993). Allgemein schienen schnelle Muskeln, wie der EDL, rasch (innerhalb von 48 Stunden) auf den Denervierungsreiz mit dem Anstieg der Muskeltranskriptionsfaktoren, dabei besonders von Myogenin und MRF4, zu reagieren. Langsam arbeitende Muskeln, wie der M. soleus, zeigten keine verstärkte Expression zu diesem frühen Zeitpunkt (Walters et al., 2000).

Diese Untersuchungen beschreiben alle die Expression der Faktoren auf Genebene, ob jedoch eine Translation zum Protein stattfindet bleibt dabei unbeachtet. Andere untersuchten deshalb gezielt das Auftreten der Transkriptionsfaktoren als Proteine und zeigten dabei ebenfalls einen Anstieg nach Denervierung (Weis, 1994; Koishi et al., 1995). Eine neue Studie stellte den Vergleich zwischen der Transkriptebene und der Proteinebene schneller und langsamer Rattenmuskulatur speziell in den Satellitenzellen an (Maier et al., 2002). Die Satellitenzellen zeigten unter Denervierung ein Expression von Myf5 auf Transkriptebene, wie in normaler Muskulatur. Vergleichbar zur normalen Muskulatur konnte in einigen wenigen Satellitenzellen Myogenin, zwei und sieben Tage nach Denervierung, nachgewiesen werden. Dies könnte auf die Unabhängigkeit der Expression von Myogenin zur neuralen Versorgung hinweisen. Im Gegensatz dazu konnte MyoD1 weder auf Proteinebene noch auf der mRNA-Ebene in Satellitenzellen denervierter Muskulatur dargestellt werden. Satellitenzellen denervierter Muskulatur könnten deshalb gegen Regenerationsreize resistenter als normale Muskulatur sein. Der MRF4 scheint keine entscheidende Rolle bei der Regulierung von Satellitenzellen unter

Denervierung zu spielen, da er auf Proteinebene zwar in Myonuclei, jedoch nicht in Satellitenzellen nachweisbar war (Maier et al., 2002).

### **1.3 Planung und Ziel dieser Arbeit**

Satellitenzellen als Spiegel der Regenerationsfähigkeit menschlicher Muskulatur spielten und spielen vermutlich auch in der Zukunft eine wichtige Rolle beim Versuch neuromuskuläre Erkrankung zu erkennen, zu erforschen und vielleicht eines Tages auch zu therapieren. Sie zeigen in ihrem ruhenden Zustand an, ob die Muskulatur überhaupt fähig ist zu regenerieren. Im aktivierten Zustand geben sie einen Hinweis auf das Ausmaß des Schadens, der behoben werden sollte. Nachdem sie wieder in den ruhenden Zustand zurückkehren, stehen sie in vermutlich unterschiedlicher Masse für erneute Regenerationsaufgaben bereit. Diese drei Stufen sollten deshalb in dieser Arbeit genauer untersucht werden. Zum einen sollten Satellitenzellen in ihrem ruhenden Zustand nachgewiesen werden, zum anderen im aktiven Zustand und ihre Differenzierungsfähigkeit in Form von Myotuben (Basophilie) dargestellt werden.

Beim Nachweis ruhender Satellitenzellen durch Immunhistochemie standen zahlreiche Antikörper zur Verfügung. In zahlreichen Voruntersuchungen zeigte sich jedoch, dass besonders dieser Teil der Arbeit nicht ganz einfach war. Sowohl ein Antikörper gegen c-met, dem Rezeptor für den HGF, als auch ein Antikörper gegen das V-CAM1 wurden getestet. Wie in verschiedenen Arbeiten vorbeschrieben, waren die Ergebnisse bei Versuchen an Rattemuskeln auch durchaus respektabel, doch an menschlicher Muskulatur zeigten die Antikörper eine hohe Hintergrundfärbung, die durch Veränderungen im Färbeverfahren nicht deutlich vermindert werden konnte. Deshalb wurde auf einen Antikörper gegen N-CAM zurückgegriffen, der für andere Untersuchungen, die im selben Labor, mit der gleichen Technik durchgeführt wurden schon verwendet wurde.

Für den Verlauf der Regeneration, nach Aktivierung der Satellitenzellen, wurden Antikörper gegen MyoD1 und Myogenin verwendet. Mit Antikörpern gegen MyoD1, einem Schlüsselprotein zu Beginn der Aktivierung und Myogenin, das bei der terminalen Differenzierung wichtige Funktionen hat, wurden bekannte Antikörper

gewählt, die schon bei Studien an Ratten im Einsatz waren. Ein Antikörper gegen p21, einem Cdk-Inhibitor, der durch MyoD1 aufreguliert wird und eine Rolle zu Beginn der terminalen Differenzierung zu spielen scheint, wurde ebenfalls getestet.

Dieser markierte jedoch neben Satellitenzellen auch andere Zellen, die in der Muskulatur unter pathologischen Bedingungen vorkamen und konnte damit nicht zur quantitativen Bestimmung verwendet werden.

Da für das Resultat der Regeneration bisher keine bestimmten Proteine als Angriffsort für Antikörper determiniert werden konnten, mussten histologische Kriterien für diesen Zweck aufgegriffen werden. Wie auch in der Routinediagnostik gebräuchlich, wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung gewählt, in welcher sich die neu gebildeten Muskelfasern als basophile Fasern darstellen.

Nachdem zahlreiche Arbeiten verschiedene tierische Modelle und dort erzeugte Schäden untersuchten, wurde in dieser Arbeit das menschliche „Original“ verwendet. In humanen Biopsien variieren viele Faktoren, wie Alter, Entnahmeort, Dauer der Erkrankung und Nebenerkrankungen, die bei Arbeiten an Tieren kontrolliert werden können. Daraus könnten sich Unterschiede in Bezug auf Verteilung und Differenzierungsfähigkeit der Satellitenzellen ergeben.

Bei der Auswahl der Biopsien wurden anhand vorliegenden Befunde drei verschiedene Gruppen gewählt: (1) Biopsien mit myopathischen Schädigungsmustern, (2) Biopsien mit neurogenem Schädigungsmustern und (3) normale Muskelbiopsien. Die erste Gruppe der myopathischen Erkrankungen wurden nochmals geteilt in Biopsien von Patienten, die an der DMD erkrankt sind und Biopsien von anderen myopathischen Erkrankungen (Andere Dystrophien).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Muskelbiopsien

Für diese Arbeit wurden anhand vorliegender Befundberichte neun Muskelbiopsien mit myopathischen Veränderungen, elf Biopsien mit neurogenen Schädigungsmustern und als Kontrollgruppe vier Präparate, ohne Anhalt für eine vorliegende Muskelerkrankung, ausgewählt. Die Biopsien stammen aus dem Archiv des Instituts für Hirnforschung der Universität Tübingen.

Basierend auf histologischen, enzymhistochemischen, immunhistochemischen und ultrastrukturellen Untersuchungen wurden die Diagnosen gestellt, welche zur Auswahl für diese Arbeit führten.

Klinische, mikroskopische und makroskopische Daten, der ausgewählten Patienten, sind in den Tabellen 2.1 bis 2.3 in drei Gruppen zusammengefasst dargestellt.

#### Biopsien mit unterschiedlichen myopathischen Veränderungen

Nummer	Alter	Geschlecht	Entnahmeort	Diagnose
1	8 Mo.	m	Unbekannt	Muskeldystrophie vom Typ Becker-Kiener
2	3 J.	m	Unbekannt	Muskeldystrophie vom Typ Duchenne
3	5 J.	m	M. gastrocnemius	Muskeldystrophie vom Typ Duchenne
4	6 J.	m	Unbekannt	Muskeldystrophie vom Typ Duchenne
5	7 J.	m	Unbekannt	Muskeldystrophie vom Typ Duchenne
6	34 J.	m	M. gastrocnemius	Progressive Muskeldystrophie
7	34 J.	m	Unbekannt	Muskeldystrophie vom Typ Becker-Kiener
8	40 J.	m	M. gastrocnemius	Gliedergürteldystrophie
9	58 J.	m	M. vastus lateralis	Chronische Myopathie

J.=Jahre; Mo.=Monate; w=weiblich; m=männlich; M.=Musculus

TABELLE 2.1

### Biopsien mit neurogener Muskelatrophie

Nummer	Alter	Geschlecht	Entnahmeort
1	27 J.	m	Unbekannt
2	52 J.	m	M. vastus
3	55 J.	m	M. deltoideus
4	56 J.	m	M. gastrocnemius
5	56 J.	m	Unbekannt
6	63 J.	m	Unbekannt
7	66 J.	m	M. gastrocnemius
8	66 J.	w	M. gastrocnemius
9	71 J.	m	M. gastrocnemius
10	74 J.	w	Unbekannt
11	76 J.	m	M. gastrocnemius

J.=Jahre; w=weiblich; m=männlich; M.=Musculus

TABELLE 2.2

### Biopsien mit normaler Muskelarchitektur

Nummer	Alter	Geschlecht	Entnahmeort
1	4 J.	m	M. gastrocnemius
2	19 J.	w	M. deltoideus
3	26 J.	m	unbekannt
4	29 J.	m	M. quadriceps

J.=Jahre; w=weiblich; m=männlich; M.=Musculus

TABELLE 2.3

Das Alter der Patienten lag zwischen acht Monaten und 76 Jahren, mit einem Mittel von 38,6 Jahren und einem Altersmedian von 37 Jahren.

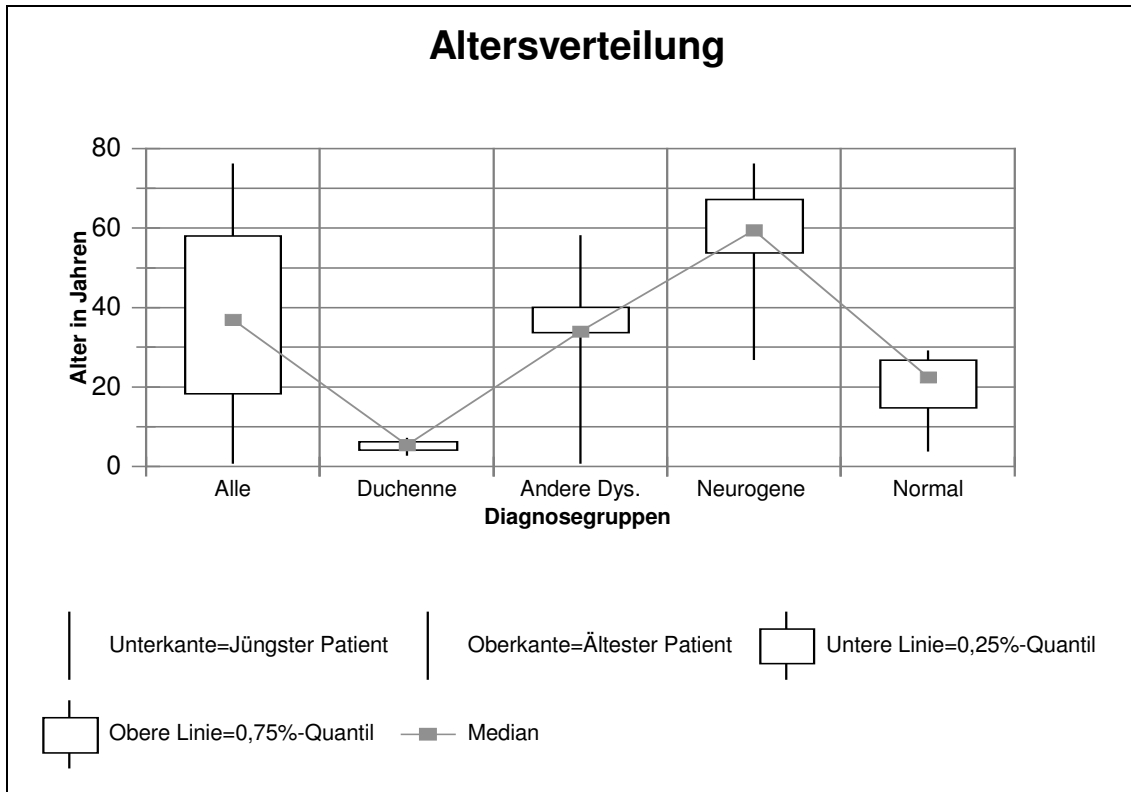
Die Altersverteilung der Gesamtgruppe (Alle) und der einzelnen Diagnosegruppen stellt sich entsprechend Tabelle 2.4 und Abb. 2.1 dar. Dabei ist bereits die Einteilung der Biopsien in Diagnosegruppen berücksichtigt, wie sie in der Auswertung verwendet wurde. Die myopathischen Veränderungen sind in Biopsien mit einer Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (Duchenne) und andere myopathische Veränderungen (Andere Dys.) unterteilt.

### Altersverteilung:

Diagnosegruppen	Jüngster Patient	Ältester Patient	Median
Alle	0,88	76	37
Duchenne	3	7	5,5
Andere Dys.	0,88	58	34
Neurogene	27	76	59,5
Normale	4	29	22,5

Altersverteilung der Biopsien, Angabe des Alters in Jahren.

TABELLE 2.4



Graphische Darstellung der Altersverteilung.

ABBILDUNG 2.1

### 2.1.2 Entnahme, Präparation, Asservierung und Routinediagnostik

Die entnommenen Muskelbiopsien gingen unfixiert, auf einem mit Kochsalzlösung getränkten Tupfer, zur neuropathologischen Beurteilung ein. Für die Routinediagnostik wurde ein Teil in, mit Stickstoff gekühltem, Isopentan bei  $-160^{\circ}\text{C}$  für 30 Sekunden schockgefroren und anschließend mit einem Gefrierkleber, Tissue Tek® auf Gefrierblöcke aufgebracht. Die Archivierung erfolgte in einem Stickstofftank bei  $-190^{\circ}\text{C}$ , wobei die Zeit zwischen Entnahme und dieser Untersuchung bis zu 7 Jahren betrug.

Kryostatschnitte von  $10\mu\text{m}$  Dicke wurden routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin (HE), Trichrom Gomori, Perjod-Schiff Säure (PAS), Ölrot und Verhoeff van Gieson gefärbt. Des weiteren wurden folgende enzymhistochemische Untersuchungen durchgeführt: Saure Phosphatase, Nicotinamid-Adenindinucleotid-Dehydrogen(NADH)-Tetrazolium-Reduktase, Cytochrom-c-Oxidase, Succinat-Dehydrogenase, Adenosin-Monophosphat-



Deaminase, Phosphorylase, myofibrilläre ATP-ase (nach saurer und alkalischer Präinkubation). Falls erforderlich schlossen sich noch immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen die Dystrophinepitope, das Adhalin, das Merosin, das Spektrin, das Vimentin, die Myosin heavy chain (MHC) und das Neural cell adhesions molecule (N-CAM) an.

Die Paraffin-Einbettung eines Teils der Biopsie erfolgte nach der Fixierung in 4%-iger gepufferter Formalinlösung. Ein anderer Teil der Biopsie wurde für die elektronenmikroskopische Begutachtung mit Glutaraldehyd fixiert und in Araldit eingebettet.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Kryostatschnitte**

Die Proben wurden nach der Entnahme aus dem Stickstofftank auf ca. -25°C erwärmt. Bei dieser Temperatur wurden am Mikrotom-Kryostat HM 500 (Firma MICROM) 9µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden auf Silan-beschichtete Objektträger aufgezogen und abhängig vom verwendeten Antikörper fixiert (vgl. Tabelle 2.5), bzw. für die HE-Färbung luftgetrocknet. Die nicht sofort verwendeten Schnitte wurden in Alufolie verpackt und bei -20°C im Gefrierschrank kurzfristig aufbewahrt.

### **2.2.2 Immunhistochemie**

#### **2.2.2.1 Grundzüge der Immunhistochemie, ABC-Methode**

Bei dieser Methode des Proteinnachweises mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, wird das vorliegende Antigen mit dagegen gerichteten Antikörpern (Primärantikörper) inkubiert. Anschließend werden die nicht gebundenen Antikörper durch Waschen entfernt und das Präparat mit einem biotinylierter Antikörper (Sekundär- oder Brückenantikörper), der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörper gerichtet ist, inkubiert. Nach erneutem Waschen wird ein Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex) aufgetragen, der mit seinen unbesetzten Biotinbindungsstellen an den biotinylierten Sekundärantikörper binden kann (Abb. 2.2). Dieser AB-Komplex ist mit

Meerrettichperoxidase enzymmarkiert, durch Zugabe von Substrat (Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$ ) entsteht ein Enzym-Substrat-Komplex. Die fortschreitende Katalyse von  $H_2O_2$  benötigt einen Elektronendonator, dieser verwandelt sich durch die Oxidation in eine unlösliche, gefärbte Verbindung. Als Elektronendonator, wegen der Verfärbung auch Chromogen genannt, wurde Diaminobenzidin (DAB) verwendet, welches ein braunes Reaktionsprodukt bildet (Boenisch, 2000).

**Avidin-Biotin-Methode, graphische Darstellung:**

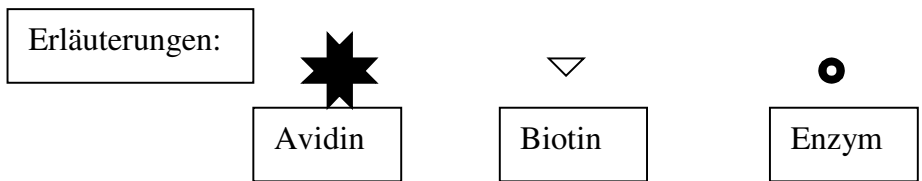
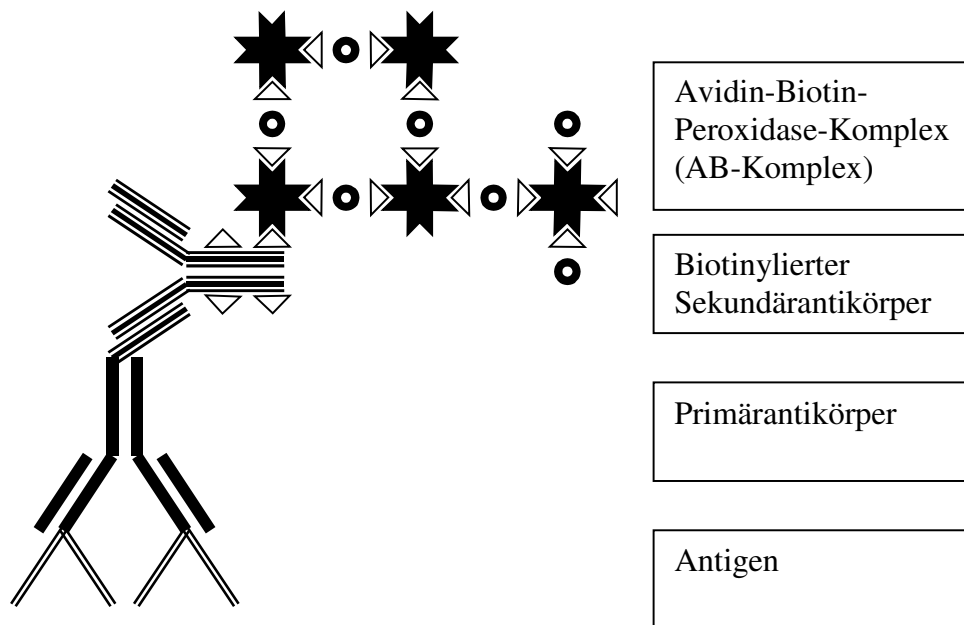


ABBILDUNG 2.2

### **2.2.2.2 Primärantikörper**

#### *2.2.2.2.1 Anti-N-CAM*

Zur Markierung der Neural cell adhesion molecule (N-CAM)-positiven Membran von Satellitenzellen wurde Anti-N-CAM (Dako, Glostrup, Dänemark; Klon: UJ13A.(1).) verwendet. Es handelt sich dabei um einen monoklonalen Mäuseantikörper des IgG2a(kappa)-Isotyps, der spezifisch die 125kDa Isoform des menschlichen N-CAM erkennt.

#### *2.2.2.2.2 Anti-MyoD1*

NCL-MyoD1 (Novocastra laboratories, Klon: 5.8A) ist ein monoklonaler Mäuseantikörper der IgG1-Klasse. Er markiert ein Epitop zwischen Aminosäure 180-189 des nukleären MyoD1 Proteins, eines skelettmuskelspezifisches Phosphoproteins von 45kDa.

#### *2.2.2.2.3 Anti-Myogenin*

Anti-Myogenin (Pharmingen, San Diego, USA; Klon: F5D) stellt einen monoklonaler Mäuseantikörper der Immunglobulinklasse IgG1 dar, der das Epitop der Aminosäuren 138-158 des ca. 34kDa großen Myogenin-Moleküls markiert.

### **2.2.2.3 Sekundärantikörper**

Als Sekundärantikörper wurden biotinylierte F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente eines Kaninchen (rb) Anti-Maus-IgG (Dako, Glostrup, Dänemark) verwendet. Es handelt sich dabei um F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente von Antimausimmunglobulinen des Kaninchens, die gegen die monoklonalen IgG-Primärantikörper gerichtet sind. Zur späteren Konjugation mit Avidin sind diese biotinyliert.

### **2.2.2.4 Verwendete Lösungen**

#### AB-Komplex (Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex):

Gleiche Menge an Avidin (Lösung A) und biotinylierter Meerrettichperoxidase (Lösung B) (Dako, Glostrup, Dänemark), wurden 1:200 mit TBS-Lösung verdünnt.

DAB-Lösung:

5mg DAB (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) wurden in 10ml TBS-Lösung gelöst und 100µl, einer 1:10 mit TBS-Lösung verdünnter, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung zugegeben.

Eosinlösung, alkoholisch:

1g Eosin wurde in 100ml 70%igen Alkohol gelöst und mit 200µl 96%iger Essigsäure versetzt.

HCl-Ethanol:

25%ige HCl wurde 1:100 mit 70%igen Ethanol verdünnt.

Schweineserum, verdünnt:

Schweineserum, das aufgetaut und 30 Minuten bei 56°C inaktiviert wurde, ist 1:10 mit TBS/Albuminpuffer verdünnt worden.

TBS/Albuminpuffer:

50mg Albumin (Serva Feinbiochemica GmbH&Co, Heidelberg) in 50ml TBS-Lösung gelöst.

TBS-Lösung:

60,6g Tris und 163,6g NaCl in 1500ml Aqua bidest. gelöst, wurde mit 25%iger HCl auf pH 7,5 titriert und auf 2000ml mit Aqua bidest. aufgefüllt. Für den weiteren Gebrauch wurde sie 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt.

Zamboni's Fixierlösung (Stefanini et al., 1967):

20g Paraformaldehydpulver in 150ml gesättigter, wässriger Pikrinsäure gelöst, wurden im Wärmeschrank auf 60°C erwärmt und zwei Stunden bei dieser Temperatur belassen. Durch tropfenweise Zugabe 2,5%iger Natronlauge wurde die Lösung neutralisiert, wobei sie klar wurde. Nachdem die Lösung gefiltert und erkaltet war, wurde sie mit Phosphatpuffer (3.31g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,H<sub>2</sub>O; 33.77g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,7H<sub>2</sub>O; 1000ml H<sub>2</sub>O; PH 7,3) auf 1000ml aufgefüllt.

### **2.2.2.5 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen**

Im Folgenden wird zunächst das Protokoll der N-CAM-Färbung erläutert und anschließend soll auf Abänderungen für die Färbungen mit Anti-MyoD1 und Anti-Myogenin eingegangen werden.

#### 1.) Inkubation mit Schweineserum / Blocken unspezifischer Bindungen

Die fixierten Schnitte (vgl. Tabelle 2.5) wurden für 15 Minuten mit dem Schweineserum beschichtet. Dieses wurde durch „Abtropfen“ vom Objektträger entfernt.

#### 2.) Inkubation mit dem Primärantikörper

Nach entsprechender Verdünnung des Antikörpers mit TBS/Albuminpuffer, wurde das Präparat mit 300µl der Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde dieser Schritt ausgelassen und statt dessen TBS-Lösung aufgebracht. Die Präparate wurden zuerst in TBS-Lösung getaucht und anschließend in einem weiteren Gefäß mit der Pufferlösung zehn Minuten auf dem Rüttler gewaschen.

#### 3.) Inkubation mit dem Sekundärantikörper

Die Präparate wurden mit 300µl, des 1:400 in TBS/Albuminpuffer verdünnten rb-Anti-m-IgG, beschichtet und für 30 Minuten bei Raumtemperatur so belassen. Der Spülvorgang erfolgte zuerst von Hand und anschließend für zehn Minuten auf dem Rüttler in TBS-Lösung.

#### 4.) Blocken der endogenen Peroxidase

Dazu wurden die Schnitte für 15 Minuten in 200ml Methanol, das mit 10ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt war, gestellt. Danach wurden sie fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Vor einer Weiterbehandlung wurden sie noch in TBS-Lösung getaucht.

#### 5.) Inkubation mit dem AB-Komplex

Es wurden 300µl, der schon mindestens 30 Minuten zuvor angesetzten Lösung, aus Avidin und biotinylierter Peroxidase, aufgetragen und für weitere 30 Minuten inkubiert. Es folgte wiederum die Spülung in TBS-Lösung für zehn Minuten.

#### 6.) Entwicklung mit DAB

Die zubereitete DAB-Lösung wurde mit einer Spritze über einen Mikrofilter (Millex; Porengröße 0,22µm) aufgebracht und für zehn Minuten unter Lichtabschluss belassen. Die Präparate wurden einzeln abgeklopft, kurz in TBS-Lösung getaucht und nochmals für zehn Minuten auf dem elektrischen Rüttler gespült. Vor dem nächsten Schritt wurden sie in Aqua bidest. getaucht.

#### 7.) Kernfärbung nach Harris

Die Präparate wurden für zwei Minuten in die Instant Hämatoxylin-Lösung gegeben, unter fließendem Wasser gespült, wiederum in Aqua bidest. getaucht und zur Differenzierung mehrmals in HCl-Ethanol geschwenkt. Sie wurden nochmals für fünf Minuten unter fließendem Wasser gespült und anschließend in Aqua bidest. getaucht.

#### 8.) Entwässerung

Zum Wasserentzug wurde eine aufsteigende Alkoholreihe durchlaufen. Nach kurzem Schwenken in 70%igen, 96%igen und dem ersten 100%igen Alkohol, wurden die Präparate für sieben Minuten in einem zweiten 100%igen Alkohol belassen. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol geklärt, danach für zweimal zehn Minuten in Xylol getaucht.

#### 9.) Eindecken

Die Objektträger wurden mit einem Deckglas unter Verwendung eines xylolhaltigen Mikroskopiereinschlussmittels eingedeckt.

Die Vorbehandlung der Präparate und die Verdünnung der Antikörper mit TBS/Albuminpuffer erfolgte für die verschiedenen Primärantikörper gemäß Tabelle 2.5. Für die Antikörper gegen MyoD1 und Myogenin wurden die Schritte 1.) und 4.) weggelassen, d.h. weder ein Blocken der unspezifischen Bindungen durch verdünntes Schweineserum, noch Blocken der endogenen Peroxidase mit Methanol und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde durchgeführt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, (vgl. 2.), erfolgte bei 4°C über Nacht. Des Weiteren wurde keine Kernfärbung nach Harris angewandt (7.)).

### **Fixierung der Schnitte und Verdünnung der Primärantikörper:**

<b>Antikörper</b>	<b>Fixierung der Schnitte in</b>	<b>Dauer der Fixierung</b>	<b>Weiterverarbeitung der Schnitte</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-N-CAM	eisgekühltem Aceton	10 Minuten	Lufttrocknung	1:100
Anti-MyoD1	Zamboni's Lösung	10 Minuten	Spülung für 3x10 Min. in 1:10 verdünnter TBS-Pufferlösung	1:100 bis 1:200
Anti-Myogenin	eisgekühltem Methanol	10 Minuten	Lufttrocknung	1:500

Tabellarische Aufstellung der unterschiedlichen Fixierungen und Verdünnungen für die verschiedenen Primärantikörper.

TABELLE 2.5

## **2.2.3 Histologie**

### **2.2.3.1 Färbemethode zur Darstellung regenerierter Muskelfasern**

Die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE), färbt die Zellkerne, entsprechend ihrem DNA-Reichtum mit Affinität zum basischen Hämatoxylin blau (basophil) und das Zytoplasma, mit seiner basischen Struktur durch Affinität zum sauren Eosinfarbstoff, rot (eosinophil). Ist das Zytoplasma jedoch reich an zytoplasmatischer RNA in Form von Ribosomen, was auf eine aktive Proteinsynthese hinweist, färbt sich dieses blauviolett. Dies wird zum Nachweis neu regenerierter Muskelfasern ausgenutzt, die sich im Gegensatz zu den rot gefärbten, nicht neu regenerierten, Skelettmuskelfasern basophil (blauviolett) anfärben. Bei Untersuchungen an Rattenmuskeln, die durch Nekroseerzeugung zur Regeneration angeregt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass sich neue Muskelfasern eine Wochen lang, in der HE-Färbung, basophil darstellen (Schmalbruch, 1976).

### **2.2.3.2 Durchführung der HE-Färbung**

Die luftgetrockneten Präparate wurden eine Minute in 1:1 mit Aqua dest. verdünnter Hämatoxylin-Lösung gefärbt und anschließend zwei Minuten in warmen Leitungswasser gebläut. Nach kurzem Spülen in Aqua dest. wurden sie kurz in die alkoholische Eosinlösung getaucht. Zur Entwässerung wurde die aufsteigende Alkoholreihe verwendet und anschließend wurde das Präparat eingedeckt (vgl. 2.2.2.5; Schritte 8.) und 9.)).

## 2.2.4 Datenerhebung

Aus den 100 angefertigten Präparaten wurden jeweils sechs Gesichtsfelder, bei geeigneter Vergrößerung ausgewählt. Lediglich bei neun der ausgewerteten Präparate war dies aufgrund der zu geringen Größe nicht möglich, stattdessen wurden nur fünf Gesichtsfelder ausgezählt. Die Gesichtsfelder wurden möglichst so ausgewählt, dass sie sich nicht überdecken. Das am Mikroskop bei 10-20facher Vergrößerung eingestellte Gesichtsfeld wurde, über eine am Mikroskop angebrachte Videokamera, in das Computerbildverarbeitungsprogramm KS 400 (Kontron-Software, Eching bei München) eingescannt. Am Bildschirm konnte das ausgesuchte Gesichtsfeld gespeichert werden, um für verschiedene interaktiv durchgeführte Zählungen, den identischen Bildausschnitt wieder zu finden. Identisch für die verschiedenen Färbungen war die zuerst durchgeführte Zählung der abgebildeten Muskelfasern. Angeschnittene Muskelfasern wurden nur dann gezählt, wenn sie mit mehr als der Hälfte ihres Volumens abgebildet waren und bei einer höheren Vergrößerung (bis 400fach) am Mikroskop sichergestellt werden konnte, dass im nicht am Computerbildschirm abgebildeten Rest der Muskelfaser keine gefärbte Zelle liegt, die so der Zählung entgangen wäre. Das Bild mit den durchnummerierten Muskelfasern wurden abgespeichert, um für spätere Fragestellungen wieder herangezogen werden zu können. Für die immunhistochemischen Färbungen wurde in einem zweiten Durchgang die Anzahl der gefärbten Zellen ermittelt. Da für eine zuverlässige Entscheidung über eine regelgerecht angefärbte Zelle, die am Bildschirm erreichte Vergrößerung nicht ausreichte, wurde dies bei 400facher Vergrößerung am Mikroskop durchgeführt und erst dann wurde die entsprechende Struktur im Bildverarbeitungsprogramm markiert. Als Bedingung für das Vorliegen einer markierten Zelle mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

- immunhistochemische Anfärbung der Zelle bzw. des Zellkernes selbst
- Nachweis eines Zellkernes

Für die Färbung mit Anti-N-CAM galt ferner:

- Satellitenzell-typische subsarkolemmale Lage der Zelle

Die markierten Zellen bekamen vom Computerprogramm wiederum eine Nummer zugewiesen und wurden getrennt von den ausgezählten Fasern abgespeichert.



Bei den Färbungen mit den Antikörpern gegen MyoD1 und Myogenin wurden die markierten Zellkerne dahingehend untersucht, ob sie alleine einer Muskelfaser zugeordnet werden konnten oder ob mehrere Zellkerne an einer Muskelfaser zu beobachten waren. Wie viele gefärbte Zellkerne einer einzigen Muskelfaser zuzuweisen waren, wurde gesondert von Hand notiert. Gefärbte Zellkerne die alleine zentral in einer Muskelfaser lagen, wurden ebenfalls gekennzeichnet.

Bei der HE-Färbung, wurde im zweiten Zählthroughang, die Anzahl der abgebildeten basophilen Fasern bestimmt. Nachdem die notwendigen Gesichtsfelder ausgezählt waren, wurde für jede Biopsie und jede Färbung getrennt, die gesamt ausgezählten Muskelfasern und die gesamt ermittelten gefärbten Zellkerne bzw. basophilen Fasern berechnet. Es wurde notiert wie oft es vorkam, dass bei einer Biopsie und einer Färbung, zentrale Kerne und mehrere gefärbte Zellkerne an einer Muskelfaser auftraten. Insgesamt wurden 591 Gesichtsfelder von 24 verschiedenen Biopsien in den vier angefertigten Färbungen ausgezählt.

## **2.2.5 Auswertung**

### **2.2.5.1 Auswertungskonzept und verwendete Software**

In den unterschiedlichen Färbungen der Muskelbiopsien wurde die Häufigkeit von markierter Zellen bzw. basophilen Fasern pro Muskelfaser bestimmt. Die erhobenen Daten wurden anschließend den einzelnen Diagnosegruppen zugeordnet. Die Werte der pathologischen Gruppen wurden mit der Normal-Gruppe verglichen.

Als Software für die statistischen Berechnungen wurden Excel (Microsoft Cooperation), Corel Quattro Pro (Corel Cooperation) und JMP (SAS Institute Inc.) verwendet.

### **2.2.5.2 Häufigkeit markierter Zellen in den immunhistochemischen Färbungen bezogen auf die verschiedenen Diagnosegruppen**

Die Werte geben die relative Häufigkeit einer markierten Zelle pro Muskelfaser an. Aus diesen Einzelwerten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung für die einzelnen Gruppen gebildet. Die einzelnen Häufigkeiten in den verschiedenen Färbungen werden logarithmiert, die so bestimmten  $\log(\text{Häufigkeiten})$  konnten als Normalverteilung angenommen werden. Durch diese Umformung kann der Dunnett's-Test angewendet werden und somit signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen

Diagnosegruppen und der Kontrolle, entsprechend den normalen Biopsien, aufgedeckt werden. Dieser Dunnett's-Test wurde für die N-CAM-, MyoD1- und Myogeninfärbung durchgeführt. Positive Werte im Dunnett's-Test sprechen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Diagnosegruppen und der Kontrolle.

#### **2.2.5.3 Relative Häufigkeit von basophilen Fasern bezogen auf die verschiedenen Diagnosegruppen.**

Die in der HE-Färbung basophil angefärbten Fasern wurden ins Verhältnis zu allen gezählten Fasern gestellt, damit ergibt sich die Häufigkeit einer basophilen Faser bezogen auf eine Muskelfaser. Da bei dieser Methode nur in Biopsien der Gruppe Duchenne, in jeder Biopsie basophile Fasern dargestellt werden konnten, bei allen anderen Diagnosegruppen jedoch Biopsien ohne basophile Fasern vorkamen, konnte ein statistischer Vergleich, wie bei den immunhistochemischen Färbungen, nicht durchgeführt werden. Die angewandten Verfahren scheiterten an der Berechnung des Logarithmus von Null, damit konnte keine Normalverteilung für weitere Tests hergestellt werden.

#### **2.2.5.4 Verteilung der gefärbten Zellen auf die Muskelfasern**

Bei den Färbungen Myogenin und MyoD1 wurde vermerkt, ob die angefärbten Zellkerne alleine einer Muskelfaser zuzuordnen sind oder ob mehrere gefärbte Zellkerne an einer einzelnen Faser vorhanden sind. Auch zentral in einer Faser liegende gefärbte Kerne wurden notiert. Damit ist die Aufteilung aller gefärbten Zellkerne in einzel-peripher liegende, einzel-zentral liegende und gemeinsam-liegende Kerne, bezogen auf die Muskelfasern möglich.

#### **2.2.5.5 Vergleich der Werte der einzelnen Biopsien in den Färbungen MyoD1, Myogenin und HE**

Aus der graphischen Darstellung der Werte für die einzelnen Biopsien, in ansteigend angeordneten Werte, bezogen auf die Häufigkeit basophiler Fasern, lassen sich Gemeinsamkeiten und Unterschiede der verschiedenen Diagnosegruppen ableiten.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Häufigkeit gefärbter Zellen und basophiler Fasern

Die erhobenen Daten für die einzelnen Biopsien sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

	N-CAM Gefärbte Zellen pro Muskelfaser	MyoD1 Gefärbte Zellkerne pro Muskelfaser	Myogenin Gefärbte Zellkerne pro Muskelfaser	HE Basophile Fasern pro Muskelfaser
<b>Biopsien Duchenne</b>				
1	0,1292	0,1313	0,1639	0,0761
2	0,0617	0,0774	0,1272	0,0921
3	0,1089	0,1325	0,1851	0,097
4	0,0641	0,131	0,2233	0,0735
<b>Biopsien Andere Dys.</b>				
1	0,0792	0,1456	0,1903	0,1146
2	0,0633	0,1244	0,1519	0,0968
3	0,0542	0,0229	0,05	0,0354
4	0,0466	0,0308	0,0517	0,0169
5	0,0765	0,0154	0,0062	0
<b>Biopsien Neurogene</b>				
1	0,057	0,0515	0,0758	0,034
2	0,0952	0,0245	0,0556	0,0858
3	0,0871	0,0216	0,0435	0,0097
4	0,0465	0,0466	0,0348	0
5	0,0491	0,0214	0,0092	0
6	0,1246	0,0252	0,0199	0,0028
7	0,0793	0,0158	0,009	0
8	0,0518	0,0129	0,0086	0
9	0,0495	0,0299	0,0107	0
10	0,0455	0,029	0,004	0
11	0,0444	0,0148	0,003	0
<b>Biopsien Normale</b>				
1	0,0414	0,0109	0,0017	0,0017
2	0,0658	0,0242	0,0097	0
3	0,0661	0,0206	0,0116	0
4	0,0326	0,0124	0,0044	0

Erhobene Daten entsprechend der Diagnose geordnet.

TABELLE 3.1

Aus diesen Einzelwerten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen für die einzelnen Diagnosegruppen berechnet, wie sie in den folgenden Abschnitten für die verschiedenen Färbungen zusammengestellt sind.

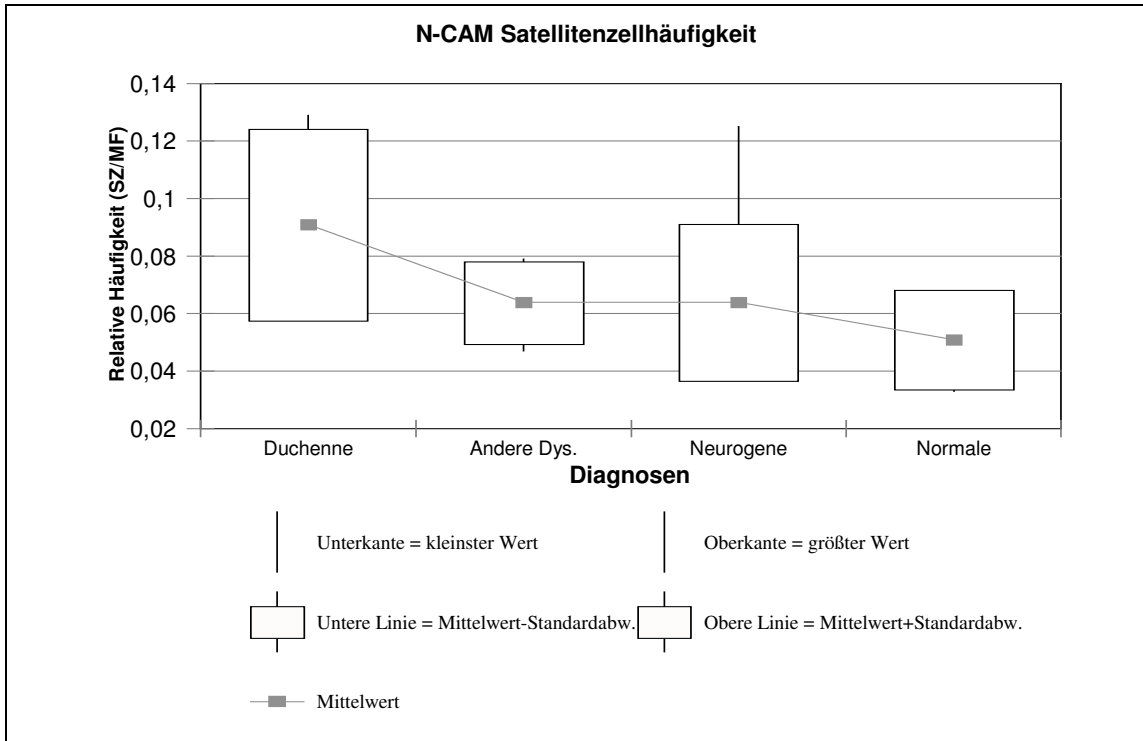
### 3.1.1 Färbung mit einem Antikörper gegen N-CAM

Die größten und kleinsten Werte und Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für die Satellitenzellhäufigkeit in der N-CAM-Färbung sind in Tabelle 3.2 und als Box- and Whiskers-Plot in Abbildung 3.1 dargestellt.

N-CAM Relative Häufigkeit von Satellitenzellen (SZ/MF)		
Diagnosegruppe	Anzahl untersuchter Biopsien	Mittelwert $\pm$ Standardabw.
Duchenne	4	0,091 $\pm$ 0,033
Andere Dys.	5	0,064 $\pm$ 0,014
Neurogene	11	0,064 $\pm$ 0,027
Normale	4	0,051 $\pm$ 0,017

SZ=gefärbte Satellitenzellen, MF=gezählte Muskelfasern  
Relative Häufigkeit von Satellitenzellen in der N-CAM Färbung

TABELLE 3.2



SZ=gefärbte Satellitenzellen, MF=gezählte Muskelfasern  
Graphische Darstellung der Werte für die N-CAM-Färbung

ABBILDUNG 3.1

Im Dunnett's-Test (Tabelle 3.3) werden die logarithmierten Satellitenzellhäufigkeiten der einzelnen Diagnosegruppen mit der Kontrollgruppe verglichen. Positive Werte würden einen signifikanten Unterschied zwischen den Vergleichs-Paaren zeigen. Es lassen sich für die N-CAM-Färbung keine deutlichen Unterschiede für die Häufigkeiten N-CAM-positiver Zellen (N-CAM+) zwischen den einzelnen Gruppen und der Kontrollgruppe nachweisen.

<b>Dunnett's-Test für die N-CAM-Färbung: Vergleich Diagnosegruppe zur Kontrolle</b>	
Duchenne	-0,02301
Andere Dystrophien	-0,16542
Neurogene	-0,16253
Normale	-0,30131

Ergebnisse des Dunnett's-Test für die Färbung N-CAM.

TABELLE 3.3

### 3.1.2 Färbung mit einem Antikörper gegen MyoD1

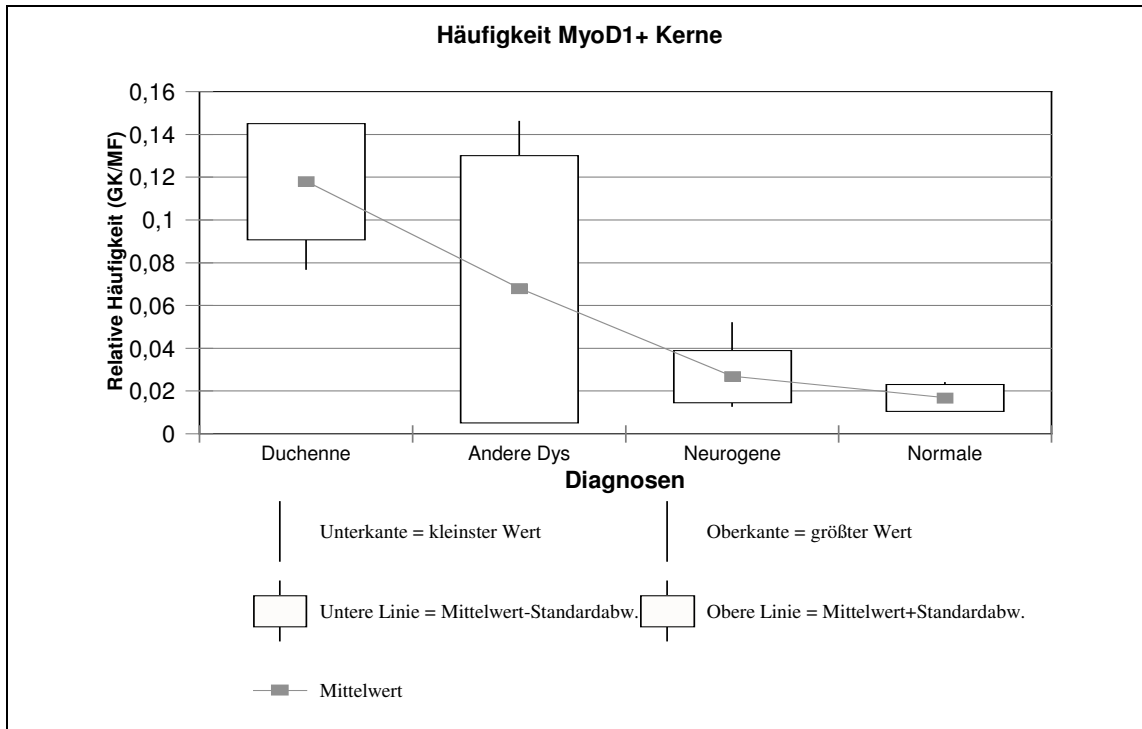
Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für die Häufigkeit MyoD1-positiver (MyoD1+) Kerne sind in Tabelle 3.4 und als Box- and Whiskers-Plot in Abbildung 3.2 dargestellt.

<b>MyoD1 Relative Häufigkeit gefärbter Kerne (GK/MF)</b>		
<b>Diagnosegruppe</b>	<b>Anzahl untersuchter Biopsien</b>	<b>Mittelwert<math>\pm</math> Standardabw.</b>
Duchenne	4	0,118 $\pm$ 0,027
Andere Dys.	5	0,068 $\pm$ 0,062
Neurogene	11	0,027 $\pm$ 0,012
Normale	4	0,017 $\pm$ 0,006

GK=gefärbte Kerne, MF=gezählte Muskelfasern  
Relative Häufigkeit MyoD1+-Kerne.

TABELLE 3.4

Im Vergleich der logarithmierten Häufigkeiten der MyoD1+ Kerne der einzelnen Diagnosegruppen mit der Kontrollgruppe mittels Dunnett's-Test (Tabelle 3.5) zeigen sich sowohl für die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne, als auch für die anderen Dystrophien in der MyoD1 Färbung positive Werte, entsprechend signifikanter Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen und den normalen Muskelbiopsien.



GK=gefärbte Kerne, MF=gezählte Muskelfasern  
 Graphische Darstellung der Werte für die MyoD1-Färbung

ABBILDUNG 3.2

<b>Dunnett's-Test für die MyoD1-Färbung: Vergleich Diagnosegruppe zur Kontrolle</b>	
Duchenne	0,486683
Andere Dystrophien	0,006495
Neurogene	-0,2145
Normale	-0,51113

Ergebnisse des Dunnett's-Test für die Färbung MyoD1.

TABELLE 3.5

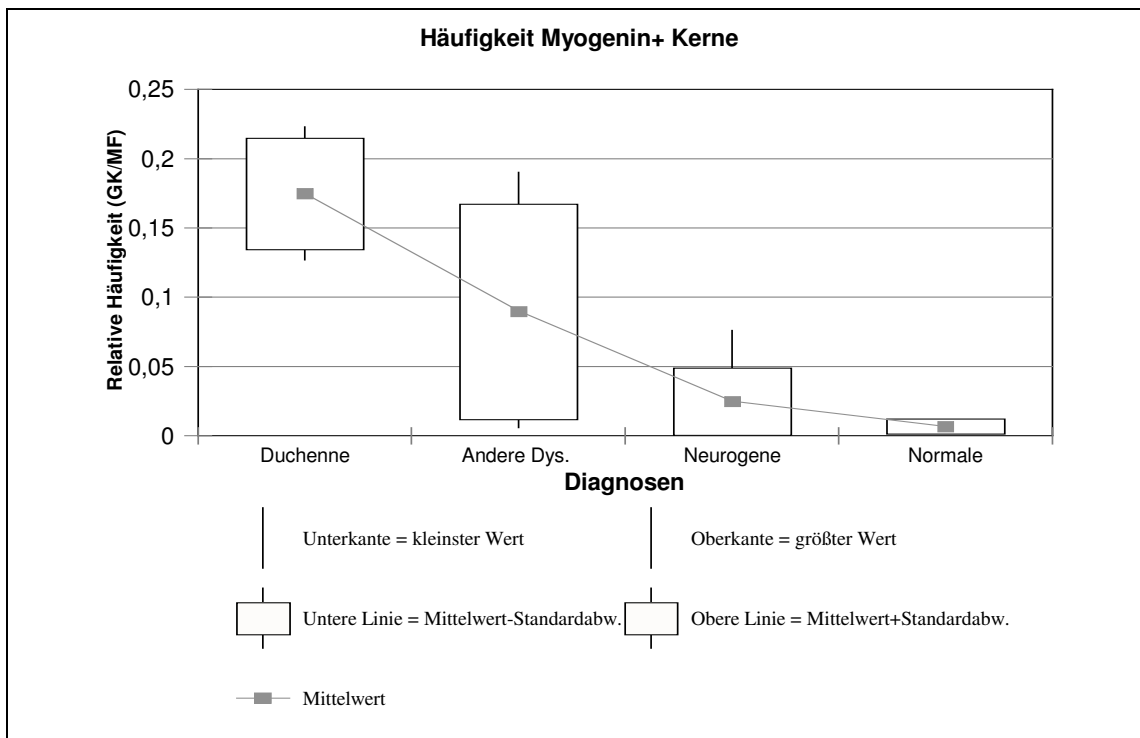
### 3.1.3 Färbung mit einem Antikörper gegen Myogenin

Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für die Häufigkeit Myogenin-positiver (Myogenin+) Zellkerne sind in Tabelle 3.6 und als Box- and Whiskers-Plot in Abbildung 3.3 dargestellt.

Myogenin Relative Häufigkeit gefärbter Kerne (GK/MF)		
Diagnosegruppe	Anzahl untersuchter Biopsien	Mittelwert± Standardabw.
Duchenne	4	0,175±0,040
Andere Dys.	5	0,090±0,077
Neurogene	11	0,025±0,024
Normale	4	0,007±0,005

GK=gefärbte Kerne, MF=gezählte Muskelfasern  
Relative Häufigkeit Myogenin+ Kerne.

TABELLE 3.6



GK=gefärbte Kerne, MF=gezählte Muskelfasern  
Graphische Darstellung der Werte für die Myogenin-Färbung

ABBILDUNG 3.3

Wie in der MyoD1-Färbung lassen sich auch in der Myogenin-Färbung durch den Dunnett's-Test, signifikante Unterschiede, sowohl zwischen der Duchenne Muskeldystrophie und der Kontrolle, als auch für die anderen Dystrophien nachweisen. Ein Vergleich der logarithmierten Häufigkeiten der einzelnen Diagnosegruppen mittels Dunnett's-Test ergeben für diese Gruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Tabelle 3.7) positive Werte.

<b>Dunnett's-Test für die Myogenin-Färbung: Vergleich Diagnosegruppe zur Kontrolle</b>	
Duchenne	0,975168
Andere Dystrophien	0,384227
Neurogene	-0,26174
Normale	-0,85229

Ergebnisse des Dunnett's-Test für die Färbung Myogenin.

TABELLE 3.7

### 3.1.4 Relative Häufigkeit basophiler Fasern in der HE-Färbung

Die größten und kleinsten Werte, sowie Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für die Häufigkeit basophiler Fasern in der Hämtoxylin-Eosin-Färbung sind in Tabelle 3.8 und als Box- and Whiskers-Plot in Abbildung 3.4 dargestellt.

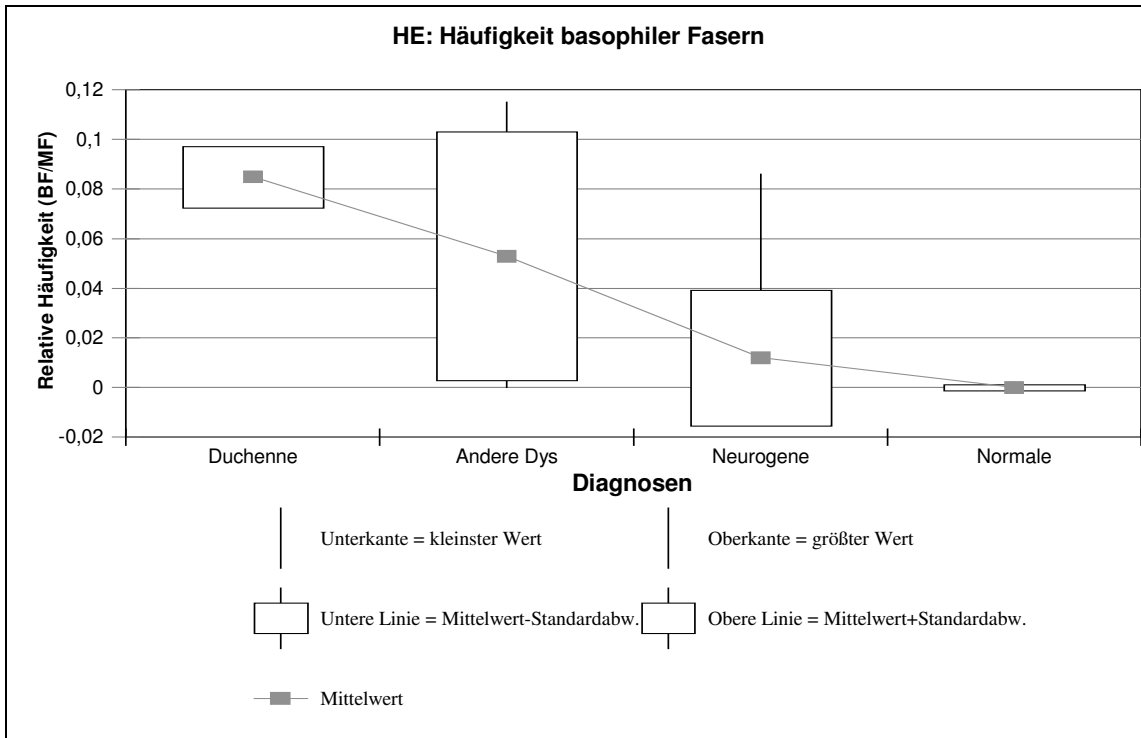
Abbildung 3.5 stellt die Einzelwerte für die Häufigkeit basophiler Fasern für die einzelnen Biopsien dar. Nur bei der Duchenne Muskeldystrophie sind immer basophile Fasern nachweisbar, bei den anderen Dystrophien, ist die relative Häufigkeit basophiler Fasern noch relativ hoch, bereits in dieser Kategorie ist eine Biopsie vertreten, in der keine basophile Faser nachweisbar ist (vgl. Tabelle 3.1). In der Gruppe neurogener Atrophien gibt es Muskelbiopsien, in denen basophile Fasern dargestellt werden können. Die Mehrzahl der Biopsien in dieser Diagnosegruppen zeigt keine basophilen Fasern. Die Biopsien normaler Muskulatur weisen in der Regel keine basophilen Fasern auf, nur in einer Biopsie färbte sich eine einzelne Faser basophil an (vgl. Abb. 3.5).

<b>HE</b>		
<b>Relative Häufigkeit von basophilen Fasern (BF/MF)</b>		
<b>Diagnosegruppe</b>	<b>Anzahl untersuchter Biopsien</b>	<b>Mittelwert <math>\pm</math> Standardabw.</b>
Duchenne	4	0,085 $\pm$ 0,012
Andere Dys.	5	0,053 $\pm$ 0,050
Neurogene	11	0,012 $\pm$ 0,027
Normale	4	0,000 $\pm$ 0,001

BF=basophil angefärbte Muskelfasern, MF=gezählte Muskelfasern  
Relative Häufigkeit von basophilen Fasern in der HE-Färbung

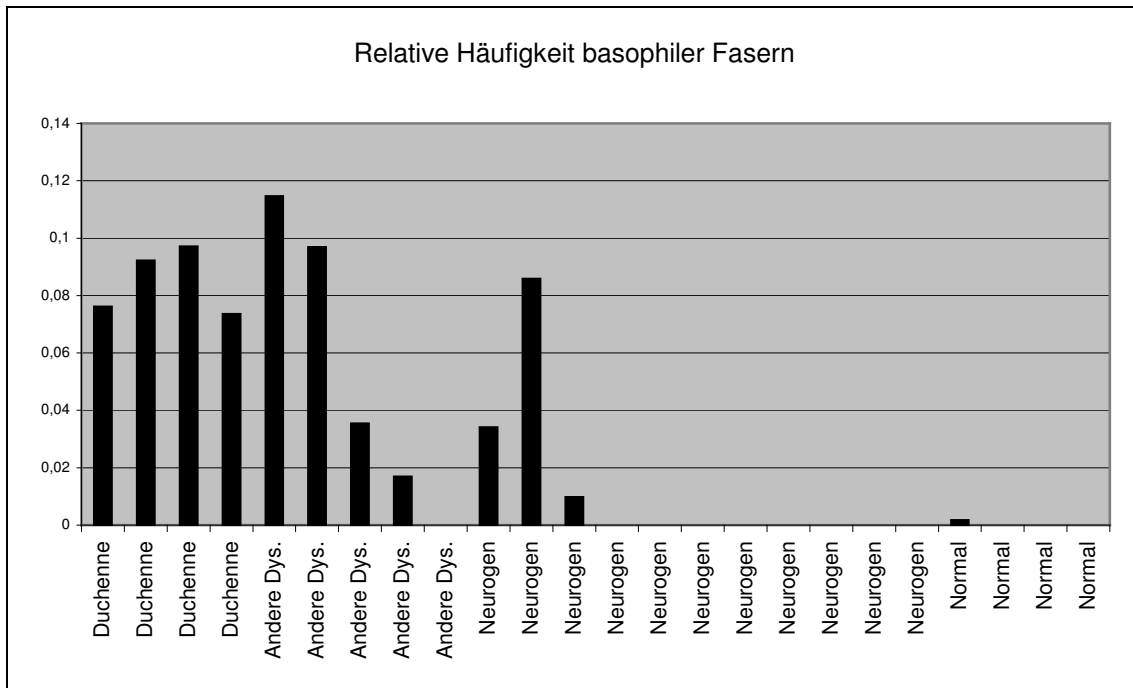
TABELLE 3.8





BF=basophil angefärbte Muskelfasern, MF=gezählte Muskelfasern  
 Graphische Darstellung der Werte für die HE-Färbung

ABBILDUNG 3.4

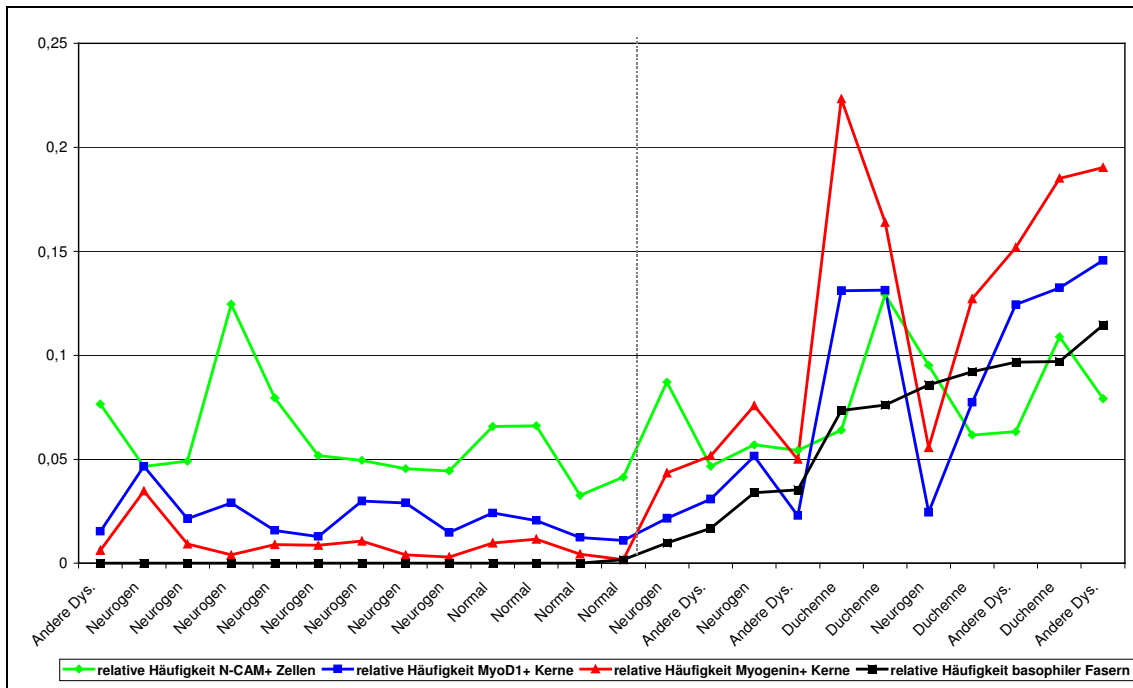


Graphische Darstellung der relativen Häufigkeit an basophilen Fasern in den einzelnen Biopsien.

ABBILDUNG 3.5

### 3.2 Vergleich der immunhistochemischen Färbungen mit der HE-Färbung

Ordnet man die Einzelwerte für die verschiedenen Biopsien nach ansteigenden Werten für basophile Fasern, so ergibt sich ein zweigeteiltes Bild (Abb. 3.6). Für die Muskelbiopsien mit keinen oder nur wenigen basophilen Fasern liegt immer eine höhere Häufigkeit für MyoD1+ als für Myogenin+ Kerne vor. Bei Biopsien, die mehrere basophile Fasern aufweisen, ist dies gerade umgekehrt. In diesen Fällen ist stets die Häufigkeit Myogenin-positiver Kerne größer als die Häufigkeit an MyoD1-positiven.



Graphische Darstellung der einzelnen Werte der Biopsien in den verschiedenen Färbungen. Geordnet nach Zunahme der relativen Häufigkeit basophiler Fasern.

ABBILDUNG 3.6

Bei Betrachtung der Häufigkeit N-CAM+ Zellen im Vergleich zu den MyoD1+ und Myogenin+ Kernen, fällt auf: bei einigen Biopsien mit hoher Basophilenrate liegt die Häufigkeit N-CAM+ Zellen unter der Häufigkeit der MyoD1+ und Myogenin+ Kerne.

### 3.3 Verteilung der gefärbten Zellkerne

Bei der Auszählung der markierten Zellkerne in den Färbungen mit Anti-MyoD1 und Anti-Myogenin wurde zudem vermerkt, ob diese alleine oder in Gruppen an einer Muskelfaser auftreten. Zudem wurden zentral innerhalb einer Faser liegende Zellkerne markiert.

Wird diese unterschiedliche Aufteilung über die einzelnen Diagnosegruppen gepoolt, entstehen die prozentualen Verteilungen entsprechend Tabelle 3.8 für MyoD1 und Tabelle 3.9 für Myogenin.

<b>MyoD1</b>	<b>1 Kern peripher</b>	<b>1 Kern zentral</b>	<b>2 Kerne</b>	<b>3 Kerne</b>	<b>4 Kerne</b>
Duchenne	59,19%	6,85%	26,17%	6,54%	1,24%
Andere Dys.	62,77%	2,19%	26,28%	8,76%	
Neurogene	96,52%	3,48%			
Normale	100%				

Prozentuale Verteilung der gefärbten Zellkerne in der MyoD1-Färbung.

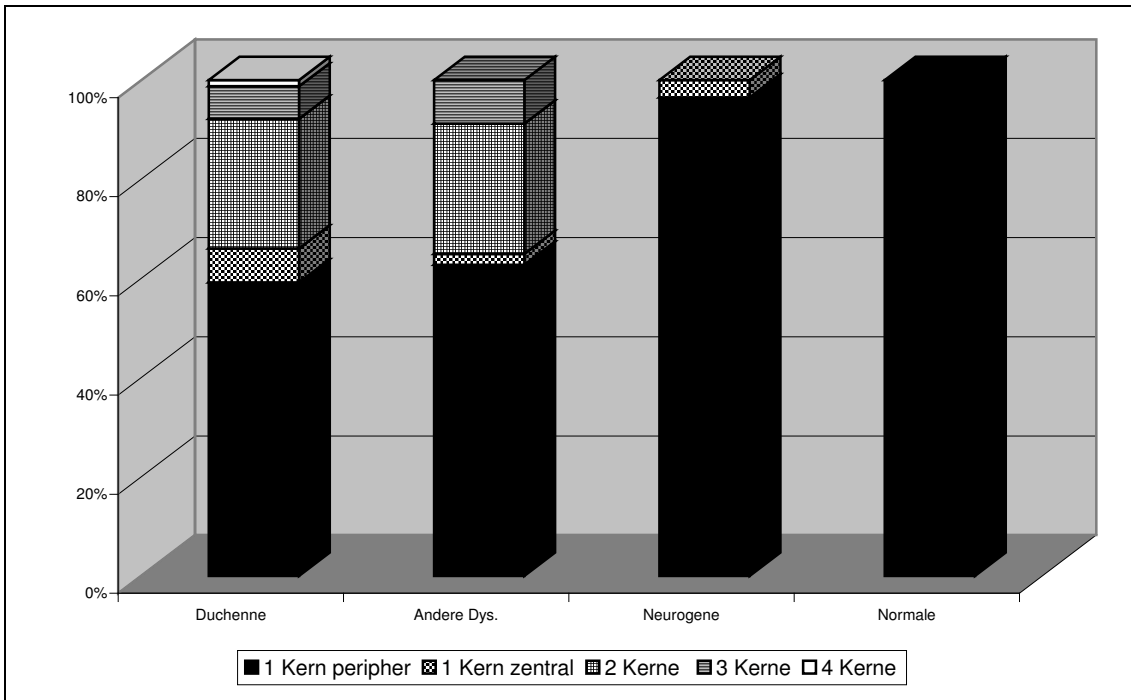
TABELLE 3.8

<b>Myogenin</b>	<b>1 Kern peripher</b>	<b>1 Kern zentral</b>	<b>2 Kerne</b>	<b>3 Kerne</b>	<b>4 Kerne</b>
Duchenne	56,39%	7,95%	23,64%	8,14%	3,88%
Andere Dys.	61,2%	17,49%	13,11%	8,2%	
Neurogene	100%				
Normale	100%				

Prozentuale Verteilung der gefärbten Zellkerne in der Myogenin-Färbung.

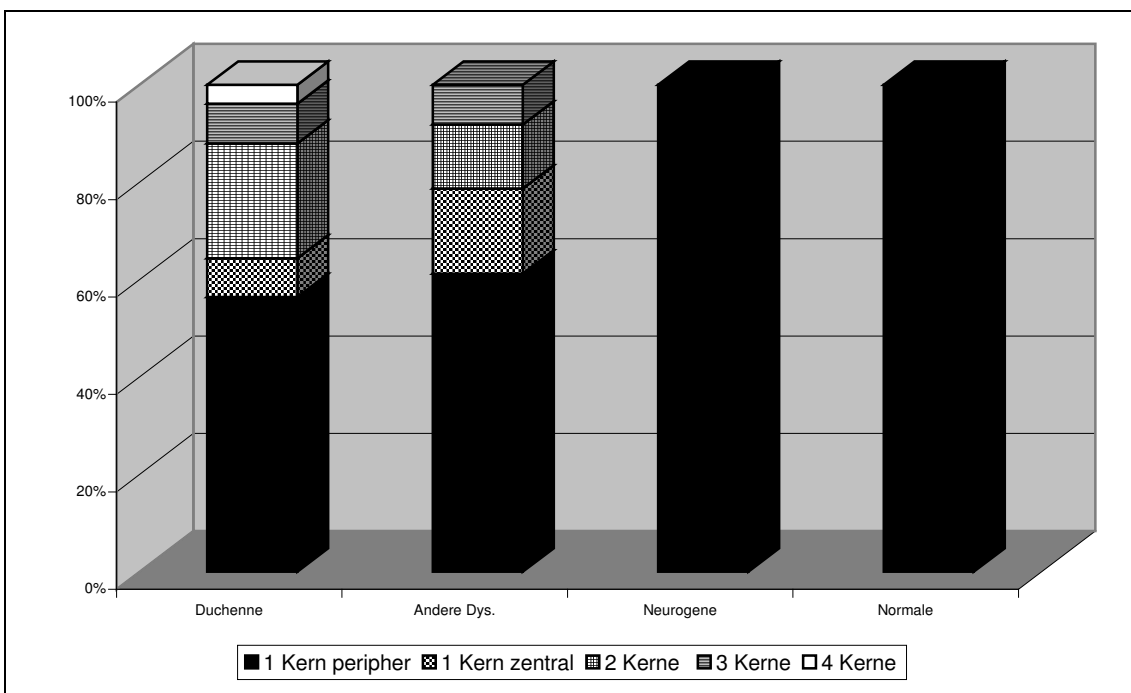
TABELLE 3.9

Bei der Betrachtung dieser Werte und der graphischen Darstellung (vgl. Abb. 3.7 und 3.8) zeigt sich, dass nur bei entsprechend starker Regeneration, mehrere gefärbte Zellkerne an einer Muskelfaser nachzuweisen sind. Starke Regeneration zeigt sich vor allem in den Gruppen der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne und den anderen Dystrophien.



Graphische Darstellung, wie sich die markierten Zellkerne in der MyoD1-Färbung verteilen.

ABBILDUNG 3.7



Graphische Darstellung, wie sich die markierten Zellkerne in der Myogenin-Färbung verteilen.

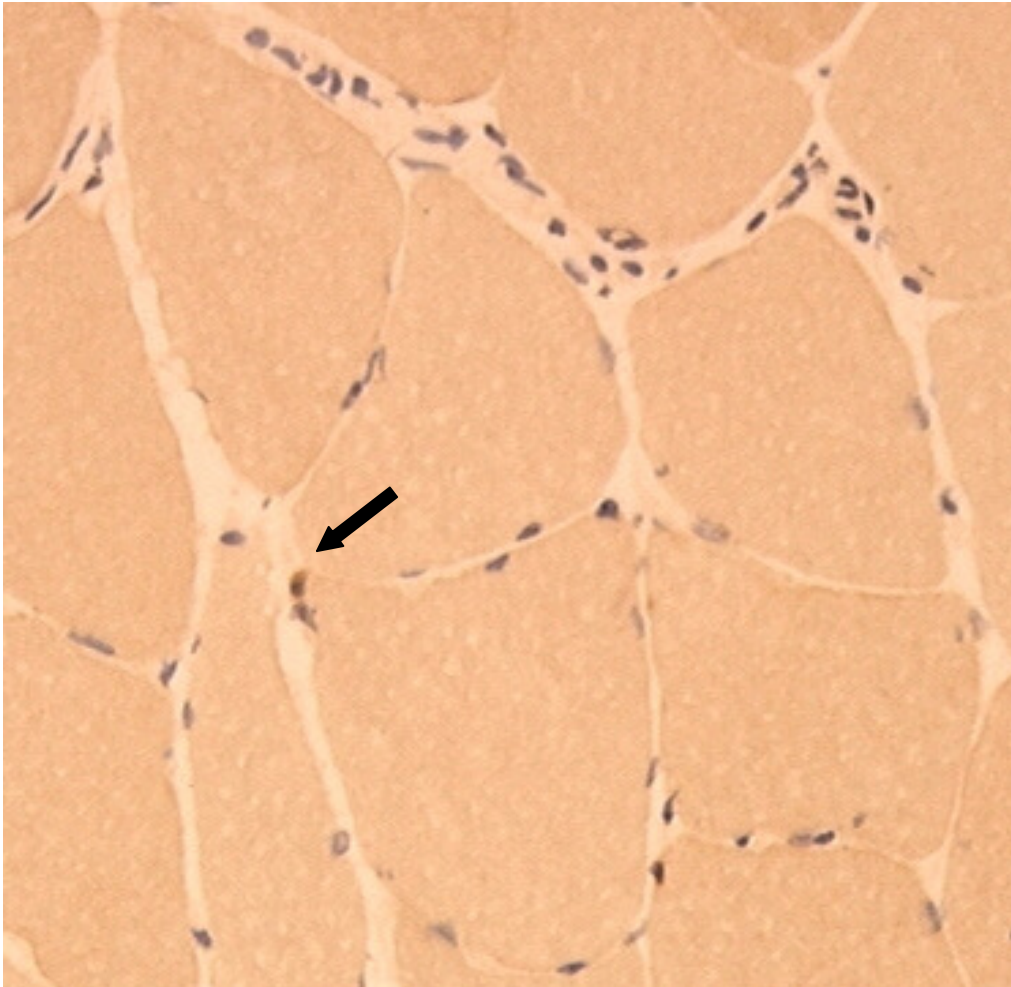
ABBILDUNG 3.8

## **4. Diskussion**

### **4.1 Häufigkeit Ncam-positiver Satellitenzellen**

Der Nachweis ruhender und aktivierter Satellitenzellen kann sowohl anhand morphologischer Kriterien elektronenmikroskopisch, als auch unter Zuhilfenahme immunhistochemischer Verfahren, lichtmikroskopisch erfolgen. Ein quantitativer Vergleich dieser beiden Methoden wurde bisher nicht durchgeführt, so dass nicht beurteilt werden kann, ob die verwendeten immunhistochemischen Marker die Gesamtheit der Satellitenzellen anfärben.

Für Anti-N-CAM ist bekannt, dass er Satellitenzellen von Mensch, Maus, Ratte und Schwein markiert (Couvalt und Sanes, 1985 und 1986; Cashman et al., 1987; Illa et al., 1992; Irnichteve et al., 1994; Olivé et al., 1997; Mesires und Doumit, 2002). Im Vergleich zur Markierung mit Anti-M-Cadherin zeigte sich, dass sich im normalen Erwachsenenmuskel deutlich mehr Anti-M-Cadherin positive, als Anti-N-CAM positive Zellen anfärben (Irnichteve et al. 1994). Aufgrund dieser Untersuchung muss davon ausgegangen werden, dass die durch Anti-N-CAM markierten Satellitenzellen, nicht die Gesamtheit aller Satellitenzellen darstellen. Da N-CAM sowohl in ruhenden, als auch in aktivierten Satellitenzellen vorkommt, setzt sich die Gruppe, der Anti-N-CAM-positiven Zellen, auf jeden Fall aus diesen beiden Zelltypen zusammen. Anti-M-Cadherin konnte allerdings für diese Untersuchung nicht verwendet werden. Er stellt einen speziesspezifischen Antikörper dar, von dem es bisher kein humanspezifisches Korrelat gibt. Antikörper gegen c-met und V-CAM1 sind in verschiedenen Arbeiten an Tieren als geeignete Marker ruhender Satellitenzellen vorbeschrieben. An menschlicher Muskulatur zeigen die Antikörper keine genügende Spezifität, die eine qualitative Auswertung ermöglichen würde. Bei der vorliegenden Untersuchung wurden deshalb die Anti-N-CAM positiven Zellen miteinander verglichen. Diese ergeben vergleichbare Populationen an Satellitenzellen in den verschiedenen Diagnosegruppen (Abb. 4.1).



N-CAM+ Satellitenzelle (➔) in einer humanen Muskelbiopsie.

ABBILDUNG 4.1

Allgemein stellen sich schon vor der Betrachtung der Werte einige Unterschiede der einzelnen Biopsien dar. Sowohl Alter, Fasertyp, als auch Dauer der Erkrankung nehmen Einfluss auf die Satellitenzellhäufigkeit (Allbrook, 1971; Gibson and Schultz, 1982 und 1983; Rodrigues und Schmalbruch, 1995; Viguie et al., 1997).

#### **4.1.1 Häufigkeit von N-CAM-positiven Zellen in normaler Skelettmuskulatur**

Die Satellitenzellhäufigkeit pro Muskelfaser in normaler humaner Muskulatur wurde bereits in mehreren Studien untersucht (Ishimoto et al., 1983; Maier und Bornemann, 1999; Watkins und Cullen, 1988). In der vorliegenden Studie zeigt sich eine Häufigkeit von 0,051 Anti-N-CAM markierten Satellitenzellen pro untersuchter Muskelfaser.

Unter gleichen Studienbedingungen wurde dieser Wert von Maier und Bornemann (1999) mit 0,055 beschrieben. Neben diesem Ergebnis, das entsprechend dem gleichen Versuchsaufbau, einen ähnlichen Wert zu dieser Studie zeigt, liegen auch die Daten der Erwachsenengruppen von Ishimoto (1983) und Watkins and Cullen (1988) im selben Bereich des hier erhobenen Wertes. Die Kindergruppe von Ishimoto wies eine erhöhte Häufigkeit an Satellitenzellen pro Muskelfaser auf.

#### **4.1.2 Häufigkeit von N-CAM-positiven Zellen in pathologisch veränderter Skelettmuskulatur**

Die Satellitenzellhäufigkeit unter pathologischen Bedingungen zeigte in verschiedenen Studien sehr unterschiedliche Ergebnisse. Deshalb ist es sinnvoll, nur Studien mit ähnlichem Studiendesign direkt miteinander zu vergleichen. Die hier erhobenen Werte zeigen im Vergleich mit Maier und Bornemann (1999) in den Gruppen der neurogenen Atrophien, Muskeldystrophien vom Typ Duchenne (DMD) und anderen Dystrophien vergleichbare Werte. Die größte Häufigkeit zeigte sich bei der DMD mit 0,091. Für die Biopsien der neurogenen Atrophien und der anderen Dystrophien stellte sich die Häufigkeit der Gruppen jeweils mit 0,064 dar. Andere Untersuchungen beschrieben sehr unterschiedliche Werte für die DMD, während Watkins und Cullen (1988) mit 0,119 einen ähnlichen Wert fanden, lag dieser bei Ischimoto (1983), mit 0,493 deutlich höher.

#### **4.1.3 Vergleich von N-CAM-positiven Zellen bei normaler und pathologisch veränderter Skelettmuskulatur**

Beim Vergleich der Mittelwerte und Extremwerte, der verschiedenen pathologischen Gruppen, gegenüber der normalen Gruppe, zeigt sich ein erhöhtes Vorkommen von N-CAM positiven Zellen bei der DMD und leicht höhere Werte für die Gruppen der anderen Dystrophien und den neurogenen Muskelatrophien (vgl. Abb. 3.1). In der statistischen Auswertung, mittels Dunnett's-Test, lassen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Diagnosegruppen nachweisen. Diese Beobachtungen stimmen mit den Aussagen von Maier und Bornemann (1999) überein. Die Ursache für die unterschiedlichen Mittelwerte, ohne nachweisbare Signifikanz, könnte die geringe Anzahl der untersuchten Muskelbiopsien in den einzelnen Gruppen,

besonders in der Kontrollgruppe, sein. Ishimoto (1983), Watkins und Cullen (1988) und Wakayama (1976) beschrieben eine deutlich erhöhte Anzahl an Satellitenzellen bei der DMD. In diesen Studien wurde die Zahl der Satellitenzellen elektronenmikroskopisch bestimmt, eine Unterscheidung zwischen ruhenden und aktivierten Satellitenzellen wurde nicht getroffen. Da bisher nicht bekannt ist, ob Anti-N-CAM alle Satellitenzellen anfärbt, könnte der Unterschied zu diesen Studien teilweise dadurch bedingt sein.

Speziell für die Gruppe der DMD bleibt die Frage offen, ob ein erhöhter Anteil an aktivierten Satellitenzellen die Grundlage des erhöhten Wertes ist oder die Grundpopulationen an Satellitenzellen gegenüber gesunder Muskulatur vergrößert ist.

Angesichts der Abnahme der Satellitenzellanzahl mit zunehmendem Alter, bis zum Erwachseneniveau, könnte die Ursache der Erhöhung Anti-N-CAM-positiver Zellen der DMD-Gruppe darin bestehen, dass das Durchschnittsalter (5,25 Jahre) in dieser Gruppe deutlich unter dem Durchschnittsalter der Gruppe mit normaler Muskulatur (19,5 Jahre) liegt (Allbrook, 1971).

Die leicht erhöhte Zahl für neurogene Atrophien könnte dafür sprechen, dass es sich bei den Biopsien überwiegend um Kurzzeit-Denervierungen der Muskulatur handelt. Rodrigues und Schmalbruch (1995) und Viguie und Mitarbeiter (1997) beschrieben eine Zunahme der Satellitenzellhäufigkeit kurz nach Eintritt einer neurogenen Schädigung mit einem Abfall der Satellitenzellhäufigkeit nach Langzeit-Denervierung.

## **4.2 Häufigkeit von MyoD1- und Myogenin- positiven Kernen**

MyoD1 und Myogenin stellen als Mitglieder der Muskelregenerationsfaktoren der MyoD-Familie, muskelspezifische Zellproteine dar. Ihre mRNA, bzw. die Proteine selbst, können in aktivierten Satellitenzellkernen nachgewiesen werden (Cooper et al., 1999; Füchtbauer und Westphal, 1992; Koishi et al., 1995). Diese Proteine sind stets in den Zellkernen der Satellitenzellen vorhanden, im Folgenden wird dies als bekannt vorausgesetzt. Markierte Zellen bezeichnen somit die angefärbten Zellkerne.

Bisher sind noch keine quantitativen Untersuchungen, hinsichtlich der Häufigkeit an MyoD1- und Myogenin-positiven Satellitenzellen in humaner Muskulatur durchgeführt worden. Füchtbauer und Westphal (1992) beschrieben das Vorkommen der Proteine



MyoD1 und Myogenin in der Skelettmuskulatur von Mäusen, die sich in Regeneration befindet. Durch Transplantation des *M. tibialis anterior* wurde sowohl Degeneration, als auch Denervierung der Muskulatur erreicht. Dabei konnten in der frühen Regenerationsphase die Proteine MyoD1 und Myogenin in mononukleären Zellen dargestellt werden. Zudem zeigten sich diese Proteine in den Zellkernen neu formierter Myotuben. Nach längerer Regenerationszeit (zwei Wochen) wurden die Proteine MyoD1 und Myogenin in den Kernen neu regenerierter Myotuben und anderen benachbarten mononukleären Zellen gefunden (Füchtbauer und Westphal, 1992).

Eine quantitative Untersuchung, bezüglich immunhistochemisch MyoD1+ und Myogenin+ Zellen wurde von Weis (1994) durchgeführt. Die Häufigkeit von MyoD1+-Kernen pro Muskelfaser beschrieb er bei normaler Rattenmuskulatur mit 0,39, gegenüber 1,16 nach Denervierung. Für Myogenin fand er einen Wert von 0,07 bei nicht geschädigter Muskulatur und 0,63 nach Denervierung. In dieser Studie wurde durch transthorakale Chirurgie einseitig der N. phrenicus durchtrennt. Anschließend untersuchte er die beiden Diaphragmaseiten getrennt. Die gegenüber anderen Studien erhöhten Werte werden heute darauf zurückgeführt, dass durch die noch innervierte Seite des Diaphragmas ein passiver Zug auf die Denervierte ausgeübt wird. Dadurch soll es zu einer zusätzlichen Satellitenzellaktivierung kommen (Carraro et al., 1985). Läsionen von Nerven einer Extremität lösen dieses Phänomen nicht aus und zeigen deshalb niedrigere Werte. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse von Weis (1994) in den folgenden Abschnitten nicht mehr einzeln diskutiert.

Koishi und Mitarbeiter (1995) untersuchten das Auftreten des MyoD1-Proteins in, durch Kälteläsionen zur Regeneration angeregten, langsamen (*M. soleus*) und schnellen (*M. tibialis anterior* oder *M. digitorum longus*) Muskeln der Ratte. Mit dieser Methode wurde reine Degeneration, ohne zusätzliche Denervierung erreicht. Es zeigte sich eine Zunahme des Proteins MyoD1 in den ersten Tagen der Regeneration, dagegen stellte sich mit Beginn der Myotubenformation eine Abnahme des Proteins ein. In welchem Zeitrahmen nach Fusion die Zellen ihre Immunreaktion mit Anti-MyoD1 verlieren, konnte nicht bestimmt werden. Im *M. tibialis anterior* der Ratte konnten auch im unverletzten Zustand einige Zellen dargestellt werden, die MyoD1+ sind (Koishi et al., 1995).

Bei der Untersuchung der Expression von MyoD1 und Myogenin bei normaler und pathologisch veränderter humaner Muskulatur, zeigten Olivé und Mitarbeiter 1997, dass in normalen und denervierten Muskelfasern nur wenig Protein nachzuweisen ist. Sie handelten diese Färbung als Hintergrundfärbung ab. In Muskeln von Patienten, die an einer Muskeldystrophie (DMD oder Muskeldystrophie vom Typ Becker) litten, ließen sich mehrere Kerne anfärben. Diese unterteilten sie in Kerne von Satellitenzellen und Kerne von Gruppen kleiner Fasern.

Der Einfluss von Denervierung, des M. tibialis anterior und des M. soleus der Ratte, auf die Muskeltranskriptionsfaktoren der MyoD-Familie wurde von Maier und Mitarbeiter (2002) untersucht. Das Vorkommen der Proteine MyoD1 und Myogenin zeigte dabei einige Unterschiede. In den nicht-denervierten M. soleus und M. tibialis anterior konnte Myogenin nicht gefunden werden. MyoD1 war dagegen in Satellitenzellen des schnell arbeitenden unverletzten M. tibialis anterior immunhistochemisch nachzuweisen. Unter Denervierung wurde zu keinem Zeitpunkt in einem der beiden Muskel das Protein MyoD1 gefunden. Myogenin ließ sich kurz nach der Denervierung noch in beiden Muskeln nachweisen, später nur noch im M soleus, bevor es nach vier Wochen Denervierungszeit in beiden Muskeln fehlte (Maier et al., 2002).

#### **4.2.1 Häufigkeit von MyoD1-positiven Kernen unter normalen und pathologischen Bedingungen**

Die in dieser Untersuchung erhobenen Daten stimmen größtenteils mit den Ergebnissen, der oben beschriebenen Studien überein. Sowohl in normalen Muskeln, als auch in solchen, mit einem neurogenen Schädigungsmuster, gibt es nur wenige Satellitenzellen, die das Protein MyoD1 enthalten (Füchtbauer und Westphal, 1992; Koishi et al., 1995; Maier et al., 2002).

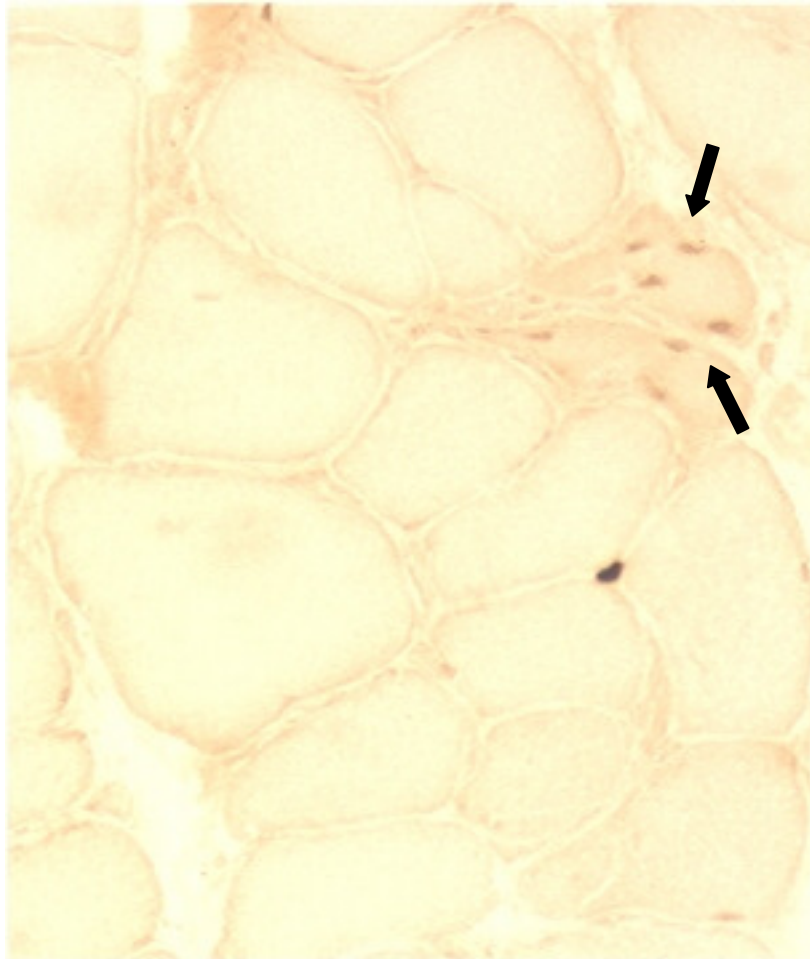
Die Häufigkeit für Anti-MyoD1+ Zellen bei den neurogenen Atrophien liegt leicht über der Häufigkeit normaler Biopsien, doch eine Signifikanz lässt sich dabei nicht festgestellt (vgl. Abb. 3.2). Die hier erhobenen Ergebnisse stellen einen Unterschied im Vergleich zu Maier et al. (2002) dar. Während in jener Studie, bei Ratten, kein Nachweis von MyoD1 erfolgte, gibt es in der vorliegenden Arbeit bei allen untersuchten Muskeln mit neurogenem Schädigungsmuster vereinzelt Zellen, die MyoD1 enthalten. Eine mögliche Erklärung ist: menschliche Biopsien zeigen kein reines neurogenes

Schädigungsmuster. Einige der untersuchten Biopsien zeigten lichtmikroskopisch Hinweise, dass neben der neurogenen Schädigung, auch eine geringgradige myopathische Schädigung vorliegt. In den Befundberichten der untersuchten neurogenen Atrophien werden zentrale Kerne, splitting fibers, Fibrose und starke Variation der Muskelfaserdurchmesser beschrieben, diese Zeichen wurden von Schmalbruch (1976) als typische Kriterien myopathischer Muskelveränderungen aufgestellt. Dies ist als sog. „Begleitmyopathie“ ein bekanntes Phänomen neurogener Muskelbiopsien, dessen Ursache unbekannt ist.

Betrachtet man die Einzelwerte der Gruppe der neurogenen Atrophien, so zeigt sich, dass fünf der elf Einzelwerte innerhalb der Extremwerte der normalen Muskelbiopsien (0,011-0,024) liegen. Die restlichen sechs Biopsien zeigen dagegen erhöhte Werte. Unter der Vorstellung einer Kurzzeit-Denervierung, mit Zunahme der Satellitenzellen, könnte es sich bei diesen Biopsien um frische neurogene Erkrankungen handeln. Dagegen soll es bei Langzeit-Denervierung zu einer entsprechenden Abnahme der Satellitenzellen kommen. Da in unserer Studie kein Einzelwert unterhalb der Werte für normale Muskelbiopsien liegt, muss angenommen werden, dass bei keiner der Biopsien dieses Stadium bisher erreicht wurde (Rodrigues und Schmalbruch, 1995; Viguie et al., 1997). Genauso könnten die sechs Biopsien, mit erhöhten Werten, Biopsien mit Begleitmyopathien darstellen, wie es oben beschrieben wurde. Unter Berücksichtigung beider Gesichtspunkte stellt sich die Frage, ob die erst kurz zurückliegende Denervierung selbst einen Anreiz zu einer Begleitmyopathie geben könnte.

Von diesen beiden Diagnosegruppen heben sich deutlich die Gruppen der anderen Dystrophien und der DMD ab (Abb. 4.2). Sie zeigen signifikant höhere Mittelwerte als die Kontrollgruppe. Die Erkrankung der DMD liegt mit Werten zwischen 0,077 und 0,133 für die Häufigkeit an Anti-MyoD1+ Zellen, mit allen erhobenen Werten, oberhalb des höchsten Wertes der Normalgruppe, der bei 0,024 liegt. Für die eher inhomogene Gruppe der anderen Dystrophien liegen die Werte zwischen 0,015 und 0,146. Myopathische Erkrankungen können folglich, sowohl mit einer Zunahme, als auch mit einer Abnahme an aktivierten Satellitenzellen ablaufen. Bei der Biopsie mit geringem Anteil an MyoD1-positiven Kernen, handelt es sich um eine chronische, nicht näher bezeichnete Myopathie. Andererseits enthält diese Gruppe auch den höchsten Wert, aller untersuchten Biopsien. Die vorliegende progressive Dystrophie zeigt schwere

myopathische Veränderungen im Sinne einer Endstadienmyopathie. Sowohl Füchtbauer und Westphal (1992), als auch Koishi und Mitarbeiter (1995) beschreiben eine Zunahme der aktivierten (MyoD1+) Satellitenzellen, nachdem eine experimentell erzeugte Läsion gesetzt wurde. Diese qualitativen Beobachtungen wurden dabei nicht quantitativ ausgewertet.



MyoD1+ Kerne (→) bei einer Biopsie eines DMD-Patienten.

ABBILDUNG 4.2

Für die DMD bzw. ihrem tierischen Modell der mdx-Mäuse ist bekannt, dass durch das Fehlen des Dystrophins, ein starker Regenerationsanreiz besteht (Coulton et al., 1988; Wakayama, 1976). Auch bei den anderen Dystrophien stellen die verschiedenen strukturellen Defizite unterschiedlich starke Reize zur Muskelregeneration. Das Vorkommen des Proteins MyoD1 bei humanen Muskeldystrophien wurde 1997 durch Olivé und Mitarbeiter beschrieben. Eine Quantifizierung der Stärke der verschiedenen Regenerationsanreize müsste über die Anzahl der aktivierten Satellitenzellen erfolgen, wie dies in der vorliegenden Studie versucht wurde.

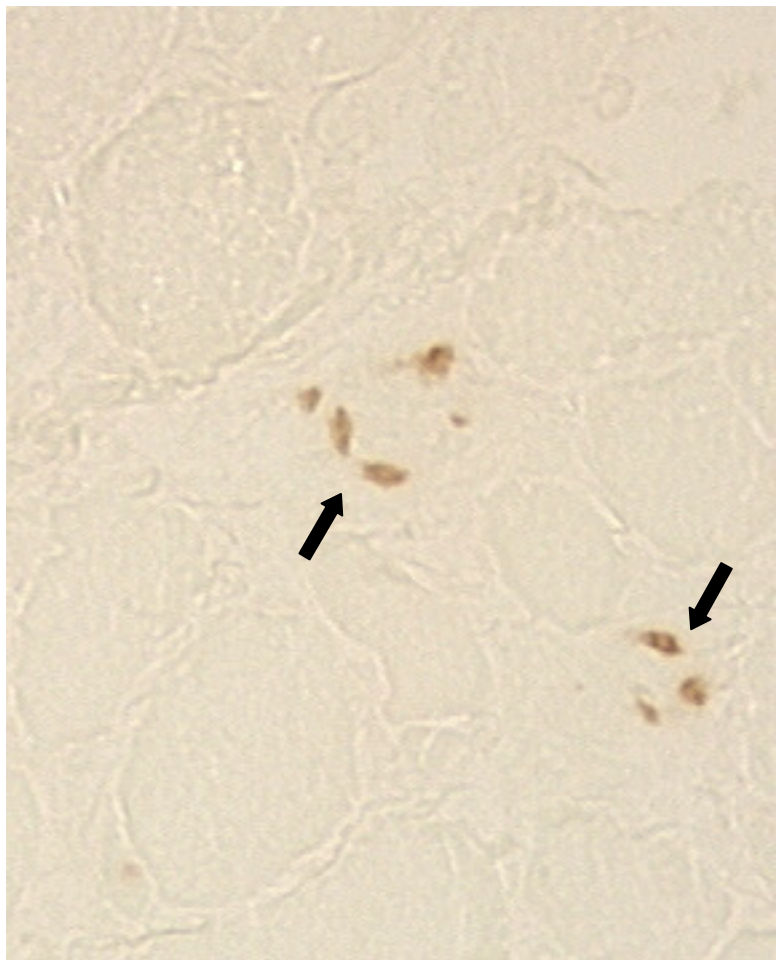
#### **4.2.2 Häufigkeit an Myogenin-positiven Kernen unter normalen und pathologischen Bedingungen**

Vergleichbar zu den Ergebnissen für MyoD1+ Zellen, stellen sich auch in der Färbung mit einem Antikörper gegen Myogenin vereinzelt positive Zellen bei der Gruppe mit normaler Muskulatur dar. Solche Satellitenzellen wurden auch von Füchtbauer und Westphal 1992 beschrieben.

In Biopsien aus Muskeln mit neurogener Atrophie sind ebenfalls nur wenige Zellen nachzuweisen, die das Protein Myogenin enthalten. Die mittlere Häufigkeit von Anti-Myogenin+ Zellen beläuft sich bei den neurogenen Atrophien auf 0,025, gegenüber 0,007 bei der Normalgruppe. Damit ist diese Häufigkeit bei Muskeln mit einer neurogenen Schädigung höher als in der Kontrollgruppe, eine Signifikanz besteht dabei jedoch nicht (vgl. Abb. 3.3). Dies lässt sich mit den Beobachtungen von Maier und Mitarbeiter (2002) vereinbaren. In jener Studie wurde beschrieben, dass beim Rattenmuskel, im schnell arbeitenden *M. tibialis anterior* mehr Satellitenzellen vorhanden sind, die Myogenin enthalten, als dies für den *M. soleus* der Fall ist. Dieses Verhältnis wendete sich jedoch zugunsten des langsam arbeitenden *M. soleus* mit einer Denervierungszeit von einer Woche, bevor sich nach längerer Denervierungszeit, überhaupt keine Zellen mehr mit einem Antikörper gegen Myogenin nachweisen lassen. Auf mRNA-Ebene wurde eine starke Zunahme von Myogenin nach Denervierung beschrieben (Buonanno, 1992).

Bei der Färbung gegen Myogenin stellen sich die Einzelwerte für die Häufigkeiten der markierten Satellitenzellen in der Normalgruppe zwischen 0,002 und 0,011 dar. Innerhalb dieser Extremwerte, liegen auch sieben der untersuchten Biopsien aus der

Gruppe der neurogenen Atrophien, die restlichen vier Biopsien hingegen zeigen erhöhte Werte. Weshalb es bei einigen, der untersuchten Muskeln mit neurogener Atrophie, zu einer Zunahme Myogenin+ Kerne kommt, bedarf den selben Überlegungen wie für die Anti-MyoD1-Färbung. Die vorliegenden Befundberichte, die eine myopathische Begleitreaktion bei einigen der untersuchten neurogenen Atrophien beschreiben, könnten eine zum Teil erhöhte Häufigkeit für Myogenin erklären. Des weiteren ließe sich auch für Myogenin die Dauer der Erkrankung, also der Unterschied zwischen Kurzzeit- und Langzeit-Denervierung, als Ursache diskutieren. Eine Kombination aus diesen beiden Konzepten wäre gleichermaßen denkbar (vgl. 4.2.1).



Myogenin+ Kerne (→) beim selben DMD-Patienten.

ABBILDUNG 4.3

Die Gruppen der anderen Dystrophien und der DMD zeigen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte Werte, für die Häufigkeit Myogenin+ Kerne (Abb. 4.3). Für die Gruppe der anderen Dystrophien, deren Einzelhäufigkeiten zwischen 0,006 und 0,190 liegen, besteht vergleichbar zur Färbung mit Anti-MyoD1, eine breite Streuung. Die Mehrzahl der Werte liegt über dem höchsten Wert der Kontrollgruppen mit 0,011. Die Häufigkeit positiver Kerne bei der chronischen Myopathie ist auch für diesen Wert gegenüber der Normalgruppe reduziert. Alle Werte der DMD-Gruppe liegen mit Werten zwischen 0,127 und 0,223 über dem höchsten Wert der Kontrollgruppe.

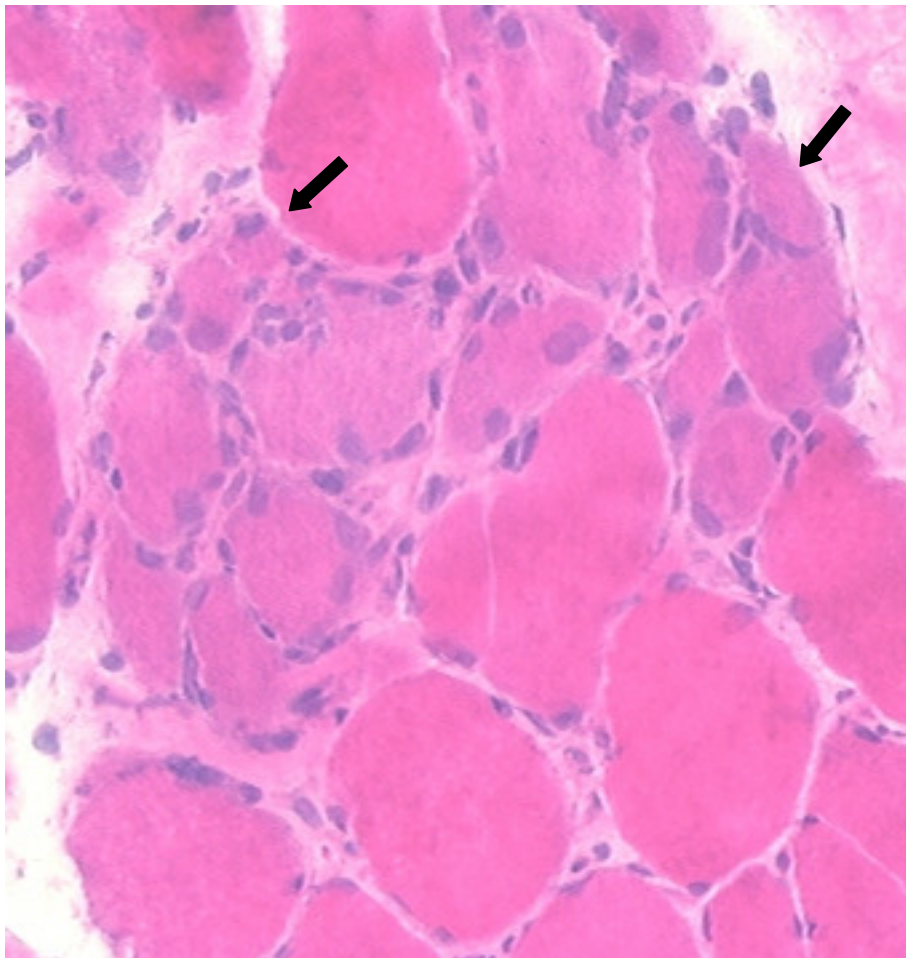
Eine Zunahme von Myogenin+ Zellen unter Regenerationsbedingungen wurde von Füchtbauer und Westphal (1992) beschrieben. Eine Erhöhung der Häufigkeit bei den myopathischen Veränderung bestätigt die quantitative Darstellung von Olivé und Mitarbeiter (1997), die eine Zunahme des Proteins Myogenin bei Muskeln der DMD und Muskeldystrophie vom Typ Becker aufzeigten.

### **4.3 Häufigkeit basophiler Fasern**

Während der Regeneration und für einige Wochen nach deren Abschluss lassen sich regenerierte Muskelfasern in der HE-Färbung basophil anfärben. Somit kann über die Häufigkeit dieser basophilen Fasern eine Aussage über das Regenerationsverhalten, der untersuchten Muskulatur, in den vergangenen Wochen gemacht werden (Schmalbruch, 1976).

In der Gruppe der normalen Muskelbiopsien lässt sich bei 1487 untersuchten Muskelfasern nur eine einzige basophile Faser darstellen. Ebenfalls eine geringe Häufigkeit zeigt sich bei den neurogenen Atrophien mit 1,2% basophilen Muskelfasern. Die einzelne basophile Faser in der Gruppe der normalen Muskelbiopsie weist darauf hin, dass auch in nicht-offensichtlich geschädigter Muskulatur Regeneration ablaufen kann. Dabei ist zu bedenken, dass die vorliegenden Muskelbiopsien der Kontrollgruppe aus irgendeinem medizinischen Grund erfolgten, das heißt der Patient zeigte zumindest klinisch den Verdacht auf eine muskuläre oder neurogene Erkrankung. Ob nun diese klinische Verdachtsdiagnose Anlass zur Regeneration gab, oder ob andere in den

Befundberichten nicht dokumentierte Faktoren, wie Muskelkater, kleine Traumata im Bereich der Entnahmestelle oder Verspannungen der Muskulatur ursächlich sein könnten, kann nicht geklärt werden. Für die geringe Zunahme der basophilen Fasern bei neurogenen Atrophien gelten die selben Vorstellungen, wie sie bereits bei den immunhistochemischen Färbungen beschrieben wurden. Sowohl die Denervierungszeit, als auch eine Begleitmyopathie könnten zu einer Zunahme an basophilen Fasern führen, wie es in drei, der untersuchten neurogenen Atrophien der Fall war (vgl. 4.2.1 und 4.2.2).



Basophile Fasern (→) bei diesem DMD Patienten.

ABBILDUNG 4.4



Dagegen steigt die Anzahl der basophilen Fasern bei den anderen Dystrophien und der DMD deutlich an (Abb. 4.4). Die Gruppe der anderen Dystrophien zeigt eine Häufigkeit von 0,053, die höchste Häufigkeit ist mit 0,085 bei der Duchenne-Gruppe zu finden. Nur in der Gruppe der DMD lassen sich in allen untersuchten Biopsien basophile Fasern nachweisen. Bei der Gruppe der anderen Dystrophien zeigt als einzige, die Biopsie der chronischen Myopathie keine basophilen Fasern. Auch bei den basophilen Fasern würde sich für die beiden letztgenannten Gruppen bestätigen, dass die zu Grunde liegenden Erkrankungen, in einem erhöhten Maße gegenüber anderen muskulären Erkrankungen und normalen Muskeln, mit stetiger Regeneration einhergehen.

#### **4.4 Vergleich von N-CAM-, MyoD1-, Myogenin- positiven Zellen und basophilen Fasern unter normalen und pathologischen Bedingungen**

Das zeitliche Auftreten der mRNAs von MyoD1 und Myogenin innerhalb des Regenerationsprozesses gibt einen Hinweis auf ihre Funktion (Megoney und Rudnicki, 1995). Während die Transkripte für MyoD1 bereits kurz nach der Aktivierung der Satellitenzellen zu finden sind, werden Transkripte für Myogenin erst später, im Zuge der Differenzierung der Satellitenzellen, nachweisbar. Das zeitliche Auftreten der Muskeltranskriptionsfaktoren der MyoD-Familie auf Proteinebene wurde bisher nicht untersucht, so dass nur über die Erkenntnisse auf Transkriptebene darauf geschlossen werden kann. Dies würde bedeuten, dass sich frisch aktivierte Satellitenzellen nur mit Anti-MyoD1 darstellen lassen. Satellitenzellen die durch Anti-Myogenin anzufärben sind, müssten schon länger aktiviert sein und terminal differenzieren. Die Anzahl basophiler Fasern gibt einen Hinweis darauf, wie viele neue Fasern im Regenerationsprozess in der unmittelbaren Vergangenheit entstanden sind. Zusammen mit Anti-N-CAM, einem Marker, der auch ruhende Satellitenzellen markiert, könnte mit diesen vier Markern eine relative Aussage über die Stärke der Regeneration zu den Zeitpunkten Grundpopulation, Beginn der Aktivierung, Differenzierung der Satellitenzellen und abgelaufene Regeneration gemacht werden.

Bei allen untersuchten Gruppen kann eine ähnliche Grundpopulation an Satellitenzellen angenommen werden, da die Werte für die Häufigkeiten N-CAM+ Zellen nicht deutlich zwischen den Diagnosegruppen und den normalen Biopsien differieren (vgl. 4.1.3). Bei den Färbungen mit Antikörpern gegen die Proteine MyoD1 und Myogenin stellten sich dagegen in den myopathisch veränderten Muskeln (DMD und andere Dys.) deutlich mehr angefärbte Kerne als in den anderen Gruppen dar. Die Expression der Transkriptionsfaktoren auf Proteinebene hat demnach bei stärkerer Regeneration eine unterschiedliche Bedeutung, im Vergleich zu normalen Biopsien und geringer Regeneration. In den neurogenen Biopsien und in normalen Biopsien ist die relative Häufigkeit N-CAM+ Zellen größer oder nahezu gleich zur Häufigkeit der aktivierten Kerne (MyoD1+ und Myogenin+). Bei den myopathischen Erkrankung übertrifft dagegen die Anzahl der aktivierten Kerne in mehreren Biopsien die Häufigkeit der N-CAM-markierten Satellitenzellen deutlich (vgl. Abb. 3.6). Füchtbauer und Westphal (1992) berichteten über die Expression der Proteine MyoD1 und Myogenin in den Kernen neu formierter Myotuben. Die erhöhten Häufigkeiten an MyoD1+ und Myogenin+ Kernen könnten bei starker Regeneration und Bildung neuer Fasern, wie auch die hohe Basophilenrate zeigt, dadurch bedingt sein, dass die Myozytenkerne der neuen Fasern diese Proteine aufweisen. Diese Biopsien könnten auch Satellitenzellen beinhalten, die in ihrem ruhenden Zustand nicht durch N-CAM nachzuweisen sind.

Während sich in der Kontrollgruppe bei allen untersuchten Muskeln mehr Kerne durch Anti-MyoD1 als durch Myogenin anfärben ließen, wendet sich bereits bei einem geringen Teil der Biopsien mit neurogenen Muskelerkrankungen dieses Verhältnis. Ordnet man die Einzelwerte für die Häufigkeit von MyoD1- und Myogenin-positiven Kernen pro Muskelfaser, nach steigenden Werten für die Häufigkeit an basophilen Fasern, so zeigen sich unter einer Häufigkeit von 0,001 basophilen Fasern höhere Werte für MyoD1 als für Myogenin. Ist diese Häufigkeit erreicht liegt der Myogenin-Wert bei allen untersuchten Biopsien über dem Wert für MyoD1 (vgl. Abb. 3.6). Cornelison und Wold (1997) beschrieben, dass nach Aktivierung der Satellitenzellen zuerst Transkripte von Myf5 oder MyoD1 nachzuweisen sind. Danach sollen beide Marker koexprimiert werden, bevor zusätzlich noch Transkripte von Myogenin und MRF4 gefunden werden. Demnach wäre anzunehmen, dass bei Satellitenzellen, die das Protein Myogenin enthalten, auch das Protein MyoD1 nachzuweisen ist. Angesichts der hier gefundenen

Situation, dass die Häufigkeit von Myogenin+ Kernen, bei starker Regeneration, größer als die Häufigkeit MyoD1+ Kernen ist, müsste ein anderer Aktivierungsweg erfolgen oder ein Verlust des MyoD1-Proteins im Verlauf der Regeneration eintreten. Die Aktivierung könnte über Myf5 erfolgen, in der anschließenden Phase der gemeinsamen Expression von Myf5 und MyoD1, müsste angenommen werden, dass MyoD1 entweder nicht transkribiert oder nicht zum Protein translatiert wird. Bhagwati und Mitarbeiter (1996) untersuchten das Vorkommen der Faktoren MyoD1, Myogenin, Myf 5 und MRF4 bei mdx-Mäusen. Sie fanden deutlich mehr Zellen die MyoD1-Transkripte enthielten, als Zellen die andere Transkriptionsfaktoren exprimieren. Dabei schien auch die Expression von MyoD1 gegenüber den anderen Muskeltranskriptionsfaktoren der MyoD-Familie verstärkt zu sein. Eine fehlende Translation zum Protein könnte sowohl die niedrigere Proteinnachweisbarkeit, als auch die erhöhte Expression der mRNA erklären. Die Variante, dass Regeneration ohne MyoD1-Expression bedingt möglich ist, wurde an Mäusen mit einem homozygoten MyoD1-Genverlust bewiesen (Yablonka-Reuveni, 1999). Dabei blieb jedoch offen, ob bei diesen Zellen die Aktivierung stets über das Protein Myf5 abläuft oder ob es weitere Möglichkeiten gibt. Für Myf5 wird angenommen, dass Satellitenzellen in der G<sub>0</sub>-Phase bereits Transkripte dieses Transkriptionsfaktors in höherem Maße enthalten (Kitzmann et al., 1998; Beauchamp et al., 2000). Auf einen Stimulationsreiz könnte Myf5 damit schnell zum Protein translatiert werden und eine Satellitenzellendifferenzierung über Myogenin könnte beschleunigt erreicht werden. Sowohl Rantanen et al. (1995), als auch Kuschel et al. (1999) beschrieben einzelne Zellen, welche sehr früh Myogenin exprimieren, bevor es Hinweise auf Proliferation der Satellitenzellen gibt. Aufgrund dieser Beobachtungen könnte es sich bei einem Teil der Zellen, die Myogenin ohne MyoD1 aufweisen, um eine Art der schnellen Regeneration, bei hohem Regenerationsanreiz handeln. Letztendlich würde eine terminale Differenzierung der Satellitenzellen, ohne vorherige Teilung, zu einer Reduktion des Pools führen. Eine nahezu gegenteilige Erklärung wäre ebenfalls denkbar. Die starke Regeneration könnte bei einigen Zellen zu einem Regenerationsverhalten führen, das vom korrekten Ablauf der Regeneration über MyoD1 abweicht und den verzögerten Weg über Myf5 oder ein anderes Protein einschlägt. Bei Mäusen, die einen Defekt für MyoD1 aufwiesen, wurde zwar eine Regeneration erreicht, doch ihre Regenerationskapazität erschien geringer und die Differenzierung zur

Myotube lief verzögert ab (Yablonka-Reuveni, 1999). Unter dieser Annahme würde sich die sogenannte ineffektive Regeneration erklären. Das bedeutet: obwohl bei schweren myopathischen Erkrankungen in erhöhtem Maße Regeneration abläuft, wie sie hier in einer erhöhten Häufigkeit an aktivierten Satellitenzellen auch zu belegen war, kann der schwere Krankheitsverlauf nicht aufgehalten werden.

Wie es zur Rekrutierung der Satellitenzellen kommt, müsste mit Doppelfärbungen für Myogenin/MyoD1 und Myogenin/Myf5 untersucht werden. Zudem könnten Marker für die Satellitenzellteilung Hinweise auf eine gleichzeitige Proliferation der Zellen geben.

#### **4.5 Verteilung der MyoD1- und Myogenin- positiven Kerne unter normalen und pathologischen Bedingungen**

Uneinigkeit besteht bisher in der Frage, wie lange die Marker Anti-MyoD1 und Anti-Myogenin in regenerierter Muskulatur nachzuweisen sind. Während Füchtbauer und Westphal (1992) diese Proteine noch in Myotuben nachweisen konnten, wurde von Koishi und Mitarbeiter (1995) keine immunhistochemische Reaktion mit Anti-MyoD1 in Myotuben gefunden. Dieser Unterschied wurde durch eine fehlende neurale Unterbrechung durch Kälteläsion, gegenüber einer Transplantation erklärt.

In den hier untersuchten Biopsien lassen sich in den Gruppen DMD und anderen Dystrophien Zellkerne nachweisen, die zentral liegen und die Proteine MyoD1 und Myogenin enthalten. Nur in der Gruppe der DMD ist dieses Merkmal in allen untersuchten Biopsien vorhanden, bei den anderen Dystrophien beschränkt es sich auf einen Teil der Biopsien. Dabei werden in diesen Gruppen (besonders der Gruppe der anderen Dystrophien) mehr zentrale Zellkerne gefunden, die Myogenin aufweisen, als Kerne die MyoD1 enthalten. Bei den Biopsien der Gruppe mit neurogenem Schädigungsmuster lassen sich nur einzelne, zentral liegende Zellkerne nachweisen. Dagegen gibt es bei den neurogenen Atrophien keine Myogenin+, zentral liegende Zellkerne. In normalen Muskelbiopsien zeigen sich keine zentrale Kerne.

Dies würde der von Koishi und Mitarbeiter (1995) aufgestellten Hypothese, dass die Denervierung ursächlich für die Darstellung von Myotuben mittels Anti-MyoD1 ist, widersprechen. Mehr als die nervale Versorgung scheint die Stärke der Regeneration

ausschlaggebend, für einen erfolgreichen Proteinnachweis für MyoD1 und Myogenin in den zentralen Kernen der Myotuben zu sein. Zudem ließen sich Myotuben, eher durch Anti-Myogenin, als durch Anti-MyoD1 anfärben. Dies könnte die Antwort liefern, weshalb Koishi und Mitarbeiter (1997), die nur mit Anti-MyoD1 Versuche machten, keine Myotuben darstellen konnten. Füchtbauer und Westphal (1995) untersuchten beide Antikörper und konnten durch Transplantation eine stärkere Regeneration als Koishi und Mitarbeiter, mittels Kältetrauma, erreicht haben. Weshalb mehr Myotuben Myogenin als MyoD1 aufweisen, macht die selben Überlegungen, wie für die erhöhte Häufigkeit Anti-Myogenin positiver Zellen bei starker Regeneration notwendig. Es müsste eine Möglichkeit geben, dass es zu einer Regenerationsvariante kommt, die entweder unabhängig vom MyoD1-Protein abläuft oder im Laufe der Regeneration das Protein nicht mehr translatiert (vgl. 4.2.1-4.2.3).

In unserer Studie zeigen sich vor allem in der Gruppen der DMD und anderen Dystrophien Fasern, die mehrere gefärbte Zellkerne enthalten. Dagegen ließen sich in den Gruppen der neurogenen Atrophien und normalen Muskelbiopsien keine Fasern mit mehreren positiven Kernen nachweisen. Dieses Merkmal von mehreren Myogenin-/MyoD1-gefärbten Zellkernen an einer einzigen Faser, könnte verschiedene Stadien der Muskelregeneration kennzeichnen. Zum Einen könnte es sich bei den dargestellten Kernen, um den Zusammenschluss von ortständigen und eingewanderten Satellitenzellen zu Beginn der Regeneration handeln. Abhängig von der Stärke der Läsion wurde beschrieben, dass es zum Anreiz kommt, Satellitenzellen aus anderen Gebieten zu rekrutieren (Lipton und Schultz, 1979; Alameddine et al., 1991; Watt et al., 1987). Möglicherweise stellen die darstellbaren Satellitenzellkerne auch das Stadium der Proliferation dieser Zellen dar. Die Kerne der Tochterzellen und der Mutterzellen könnten sich gemeinsam auf einem Schnitt durch die Muskelfaser darstellen lassen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es sich um Zellen handelt, die sich gerade auf eine Fusion zur Myotube vorbereiten oder schon fusioniert sind. Die Myotube enthält mehrere Zellkerne, die sich entlang der Längsachse ausrichten, im Querschnitt erscheinen diese als zentral liegende Zellkerne. Vor einer solchen Orientierung, könnte jedoch der Zusammenschluss einzelner Satellitenzellen stehen, die sich differenziert haben. Dadurch wäre auch das Bild von mehreren Satellitenzellkernen an einer Muskelfaser möglich. Nach der Myotubenformation nehmen die Myozytenkerne ihre

typische periphere Lage ein. Auch zu diesem Zeitpunkt könnten einige Kerne die Proteine MyoD1 oder Myogenin beinhalten. Um zu klären, welche Möglichkeit die Tatsächliche ist, sind weitere Untersuchungen notwendig. Dabei müssten die Muskelfasern im Längsschnitt dargestellt und gleichzeitig das Teilungsverhalten der Satellitenzellen gekennzeichnet werden.

## **4.6 Schlussfolgerungen**

Mit der N-CAM Färbung wurde versucht eine unterschiedliche Anzahl an ruhenden Satellitenzellen bei den verschiedenen Erkrankungen herauszuarbeiten. Grundsätzlich muss die Einschränkung beachtet werden, dass N-CAM neben ruhenden Satellitenzellen aktivierte markiert. Bei dieser Untersuchung können zwar Unterschiede in der Häufigkeit N-CAM positiver Satellitenzellen festgestellt werden, jedoch ergibt sich keine Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen. Damit muss von einer mehr oder weniger konstanten Grundpopulation, an Satellitenzellen in den untersuchten Biopsien ausgegangen werden.

Signifikant erhöhte Häufigkeiten markierter Zellen für die Gruppen DMD und andere Dystrophien zeigen sich in den immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern, gegen die Proteine MyoD1 und Myogenin. Folglich lässt sich nur in diesen Gruppen eine statistisch erhöhte Rate an Regeneration gegenüber normalen Muskelbiopsien nachweisen. In der Gruppe der neurogenen Atrophien zeigen zwar einzelne Biopsien erhöhte Werte, dagegen liegen viele im Bereich der normalen Biopsien. Auf diese Weise lässt sich die fehlende Signifikanz bei Betrachtung der gesamten Gruppe erklären. Gleichzeitig verlangt diese Tatsache, der „Zweiteilung“ dieser Gruppe nach möglichen Erklärungen. Da bei allen untersuchten Biopsien vereinzelt MyoD1+ und Myogenin+ Kerne auftraten ist festzuhalten, dass in allen Untersuchten Muskeln einige Zellen aktiv sind. Während sich bei myopathischen Veränderungen, die Ursache für die Muskelregeneration in strukturellen Defiziten innerhalb der Muskulatur selbst darstellt, liegt diese bei neurogenen Atrophien außerhalb der Muskulatur in der neurogenen Versorgung. Die direkte Verbindung von Muskulatur und nervaler Versorgung findet nur an der neuromuskulären Endplatte statt. Eine Denervierung unabhängig, ob diese im

zentralen oder peripheren Nervensystem liegt, ist ein erworbener oder von Geburt an bestehender Zustand, der keine größeren Änderungen im Verlauf der Erkrankung ergibt. Mit dem Zeitpunkt der fehlenden nervalen Versorgung stellt sich eine Veränderung der Aktivität im betroffenen Muskel ein. Zu Beginn der neurogenen Atrophie geht von der Denervierung ein Regenerationsanreiz aus. Bleibt der Muskel auch weiterhin von der nervalen Versorgung getrennt, kommt es zur fortschreitenden Atrophie und weitere Regerationsversuche unterbleiben. Dementsprechend treten zunächst Veränderungen im Sinne einer Kurzzeit-Denervierung auf, bevor das Stadium der Langzeit-Denervierung eintritt, das mit einem nahezu gänzlichen Verlust der Satellitenzellen einhergeht und nach heutigen Erkenntnissen nicht mehr rückgängig ist (Rodrigues und Schmalbruch, 1995; Viguie et al., 1997). Entweder stellen die Biopsien, die erhöhte Regenerationswerte zeigen, Muskeln dar, die sich im Stadium der Kurzzeit-Denervierung befinden, oder es handelt sich um Muskelbiopsien, die eine Begleitmyopathie aufweisen, deren Ursprung bisher nicht bekannt ist. Grundsätzlich wäre auch denkbar, dass es beim Menschen, durch das Eintreten einer Denervierung, zu einer myopathischen Veränderung kommt, die das Stadium der Kurzzeit-Denervierung darstellt. Die myopathischen Veränderungen dagegen, stellen einen stetigen Reiz zur Regeneration dar, die neu gebildeten Muskelfasern enthalten den gleichen Defekt, wie die gerade zugrunde gegangenen, so dass mit der Zeit auch diese degenerieren und Anlass zu neuer Regeneration geben.

Bei einigen Biopsien die sich alle durch eine sehr hohe Basophilenrate auszeichneten ließen sich mehr Kerne durch MyoD1 und Myogenin markieren als Zellen durch N-CAM darzustellen waren. Bisher ist noch nicht bekannt wie lange Satellitenzellen nach Aktivierung N-CAM aufweisen und wie viele ruhende Satellitenzellen nicht N-CAM+ sind. Starke Regeneration, gekennzeichnet durch ein erhöhtes Vorkommen an basophilen Fasern, geht mit einem Anstieg der Satellitenzellen einher, die das Protein Myogenin enthalten. Früher wurde vermutet, dass MyoD1 in allen aktivierten Satellitenzellen vorkommt. Mäuse mit einem homozygoten Gendefekt für MyoD1 waren in der Lage, in eingeschränktem Maße, Regeneration zu betreiben. Somit muss es Faktoren geben, welche die Aufgabe des MyoD1-Proteines teilweise übernehmen können. Weshalb gerade bei starker Regeneration ein solches Muster auftritt bleibt spekulativ. Es könnte sich dabei um Zellen handeln, die besonders schnell

Regenerationsaufgaben erfüllen oder Zellen die ohne vorher zu proliferieren terminal zu Myozyten differenzieren. Darüber hinaus ist auch nicht auszuschließen, dass sich die Zunahme Myogenin+ Satellitenzellen aus einem Regeationsmuster erklärt, welches nicht den normalen Ablauf nimmt und damit einen qualitativ schlechteren Weg einschlägt. Diese Überlegung stützt sich auf Ergebnisse, die eine verminderte und verzögerte Regeneration bei MyoD1-defizienten Tieren beschrieben (Yablonka-Reuveni et al., 1999).

Myotubenformationen, die sich anhand von MyoD1- und Myogenin-positiven zentralen Kernen darstellen lassen, sind nur in den Gruppen DMD und andere Dystrophien in entsprechendem Maße vorhanden. Der Nachweis von Fasern, die mehr als einen gefärbten Zellkern aufweisen, bleibt auf die Gruppen der DMD und der anderen Dystrophien beschränkt. Damit ist anzunehmen, dass diese Formationen nur bei starker Regeneration darzustellen sind.



## 5. Zusammenfassung

Satellitenzellen sind mononukleäre Zellen, die sich während der embryonalen Entwicklung von den terminal differenzierten Myoblasten trennen und in die G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus eintreten. Sie sind durch ihre periphere Lage an den Muskelfasern, im Spalt zwischen Basal- und Plasmamembran gekennzeichnet und sind alleinige Träger des postnatalen Muskelaufbaus. Auf bestimmte Stimuli, wie Verletzung, Muskelfaseruntergang, Verlust der nervalen Versorgung oder reine Überbelastung der Muskulatur verlassen sie ihr Ruhestadium und kehren in den Zellzyklus zurück.

Die lichtmikroskopische Identifizierung der ruhenden und aktivierten Satellitenzellen bedarf immunhistochemischer Marker, die sie von den normalen Muskelfaserkernen unterscheiden lassen. Verschiedene Marker sind in der Lage ruhende Zellen zu markieren, zu diesen gehört das Neurale cell adhesions molecule (N-CAM). Dieses Protein kommt ferner auch in aktivierten Satellitenzellen vor. Die Muskeltranskriptionsfaktoren der MyoD-Familie stellen Proteine dar, die während der Myogenese dazu beitragen, dass aus den Somitenzellen, Zellen mit myogener Differenzierung werden. Zu diesen zählen MyoD1, Myf5, Myogenin und MRF4. Ähnlich zu ihrer Funktion in der embryonalen Entwicklung haben sie spezielle Funktionen in der Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und Fusion von Satellitenzellen unter Regenerationsbedingungen. MyoD1 und Myf5 sind Faktoren, die nach einer Aktivierung früh exprimiert werden, während Myogenin erst im Zuge der Fusion und Differenzierung auftritt. Die Rolle von MRF4 ist noch nicht genau aufgeklärt. Nach Abschluss der Regeneration ist das Zytoplasma, der im Prozess beteiligten Muskelfasern, reich an RNA, weshalb sich diese in der Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung basophil anfärben. Diese Arbeit wollte die Expression der Markern MyoD1 und Myogenin, als Ausdruck aktivierter Satellitenzellen, unter verschiedenen Bedingungen qualitativ und quantitativ in humanem Gewebe beurteilen. Mit einem Antikörpern gegen Anti-N-CAM wurde, soweit möglich, die Gesamtheit der Satellitenzellen erfasst, also ruhende und aktivierte. Mit Antikörpern gegen MyoD1 und Myogenin wurden die aktivierten Satellitenzellen markiert. Dabei diente MyoD1 als Marker der frühen Phase des Zellzyklus (Determinierungsfaktor), Myogenin als

Indikator der terminalen Differenzierung (Differenzierungsfaktor). Weiterhin wurde die Anzahl basophiler Fasern ermittelt. Diese stellen einen Indikator für die Muskelfaserneubildung dar, der unabhängig von der Expression von MyoD1 oder Myogenin ist. Untersucht wurden humane Muskelbiopsien, vier Biopsien einer Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (DMD), fünf andere Dystrophien (zusammengesetzt aus zwei Muskeldystrophien vom Typ Becker; je einer progressiven Dystrophie, Gliedergürteldystrophie und chronischen Myopathie), elf Biopsien mit einem neurogenen Schädigungsmuster und vier Biopsien normaler Muskulatur, als Kontrollgruppe.

In der Färbung mittels einem Antikörper gegen N-CAM zeigte sich eine ziemlich konstante Häufigkeit an Satellitenzellen (N-CAM+), die vergleichbare Werte zu ähnlich konzipierten Studien erbrachte. Normale Skelettmuskulatur, Dystrophien und Muskeln, die einen Defekt in der nervalen Versorgung aufweisen, wiesen keine signifikanten Unterschiede in den Häufigkeiten, der N-CAM+ Satellitenzellen pro Muskelfaser auf. Mit Antikörpern gegen die Muskeltranskriptionsfaktoren der MyoD-Familie, MyoD1 und Myogenin wurden aktivierte Satellitenzellen (MyoD1+ bzw. Myogenin+) markiert. In allen untersuchten Diagnosegruppen ließen sich solche Zellen nachweisen. Bei der Gruppe der DMD und anderen Dystrophien lag die Häufigkeit der MyoD1+ und Myogenin+ Zellen signifikant über der Häufigkeit normaler Biopsien. Regeneration, wie sie durch basophile Fasern nachgewiesen wurde, konnte im Wesentlichen nur in den Gruppen der DMD und anderen Dystrophien markiert werden. Die Tatsache, dass in allen Diagnosegruppen aktivierte Satellitenzellen gefunden wurden, aber nur bei den Dystrophien Regeneration, in Form von basophilen Fasern, darzustellen war, müsste eine unterschiedliche Bedeutung der Expression dieser Faktoren ausdrücken. Bei der DMD und anderen Dystrophien repräsentieren MyoD1+ und Myogenin+ Zellen direkt die Regeneration. Sie übertreffen sogar die Häufigkeit der N-CAM+- Zellen. Damit scheinen die MyoD1+- und Myogenin+ Zellen eine Summe aus Satellitenzellkernen und Muskelfasernkernen darzustellen. Darauf deutet auch die Darstellung zentraler MyoD1+ und Myogenin+ Kerne bei der Gruppe der Dystrophien hin. Bei neurogenen Atrophien zeigte sich eine geringe Häufigkeit der Marker, vergleichbar zu verschiedenen Daten, die auf Transkript- und Proteinebene bei Tieren gewonnen wurden.

## 6. Literaturverzeichnis

Adams L, Carlson BM, Henderson L, Goldman D. (1995)  
Adaptation of nicotinic acetylcholine receptor, myogenin, and MRF4 gene expression to long-term muscle denervation.  
J Cell Biol., 131, 1341-1349.

Adams GR, Haddad F.(1996)  
The relationships among IGF-1, DNA content, and protein accumulation during skeletal muscle hypertrophy.  
J Appl Physiol., 81, 2509-2516.

Adams GR, McCue SA. (1998)  
Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats.  
J Appl Physiol., 84, 1716-1722.

Alameddine HS, Hantai D, Dehaupas M, Fardeau M. (1991)  
Role of persisting basement membrane in the reorganization of myofibres originating from myogenic cell grafts in the rat.  
Neuromuscul Disord., 1, 143-152.

Allbrook DB, Han MF, Hellmuth AE. (1971)  
Population of muscle satellite cells in relation to age and mitotic activity.  
Pathology., 3, 223-243.

Allen RE, Rankin LL, Greene EA, Boxhorn LK, Johnson SE, Taylor RG, Pierce PR. (1991)  
Desmin is present in proliferating rat muscle satellite cells but not in bovine muscle satellite cells.  
J Cell Physiol., 149, 525-535.

Allen RE, Sheehan SM, Taylor RG, Kendall TL, Rice GM. (1995)  
Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro.  
J Cell Physiol., 165, 307-312.

Aloisi M. (1970)  
Patterns of muscle regeneration, 180-193.  
In: Mauro A, Shafiq SA, Milhorat AT.: Regeneration of striated muscle, and myogenesis.  
Exerpta Medica, Amsterdam

Anastasi S, Giordano S, Sthandier O, Gambarotta G, Maione R, Comoglio P, Amati P. (1997)

A natural hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in myoblast cells and the effect of the constitutive Met kinase activation on myogenic differentiation.  
J Cell Biol., 137, 1057-1068.

Appell HJ, Forsberg S, Hollmann W. (1988)

Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neof ormation.  
Int J Sports Med., 9, 297-299.

Armand O, Boutineau AM, Mauger A, Pautou MP, Kieny M. (1983)

Origin of satellite cells in avian skeletal muscles.  
Arch Anat Microsc Morphol Exp., 72, 163-181.

Austin L, Bower J, Kurek J, Vakakis N. (1992)

Effects of leukaemia inhibitory factor and other cytokines on murine and human myoblast proliferation.  
J Neurol Sci., 112, 185-191.

Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. (2000)

Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells.  
J Cell Biol., 151, 1221-1134.

Beddington RS, Martin P. (1989)

An in situ transgenic enzyme marker to monitor migration of cells in the mid-gestation mouse embryo. Somite contribution to the early forelimb bud.  
Mol Biol Med., 6, 263-274.

Bhagwati S, Ghatpande A, Shafiq SA, Leung B. (1996)

In situ hybridization analysis for expression of myogenic regulatory factors in regenerating muscle of mdx mouse.  
J Neuropathol Exp Neurol., 55, 509-514.

Billington L, Carlson BM. (1996)

The recovery of long-term denervated rat muscles after Marcaine treatment and grafting.  
J Neurol Sci., 144, 147-155.

Bischoff R. (1994)

The satellite cell and muscle regeneration, 97-118.  
In: Engel AG, Franzini-Armstrong C.: Myology.  
McGraw-Hill, New York.

- Bischoff R. (1997)  
Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells.  
*Dev Dyn.*, 208, 505-515.
- Bober E, Lyons GE, Braun T, Cossu G, Buckingham M, Arnold HH. (1991)  
The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development.  
*J Cell Biol.*, 113, 1255-1265.
- Bockhold KJ, Rosenblatt JD, Partridge TA. (1998)  
Aging normal and dystrophic mouse muscle: analysis of myogenicity in cultures of living single fibers.  
*Muscle Nerve.*, 21, 173-183.
- Boenisch T. (2000)  
Färbemethoden.  
In: Naish SF.: *Handbuch II immunchemischer Färbemethoden*.  
4. Aufl., DAKO Corporation, Carpinteria, USA.
- Borneman A, Kuschel R, Fujisawa-Sehara A. (2000)  
Analysis for transcript expression of meltrin alpha in normal, regenerating, and denervated rat muscle.  
*J Muscle Res Cell Motil.*, 21, 475-480.
- Bornemann A, Schmalbruch H. (1992)  
Desmin and vimentin in regenerating muscles.  
*Muscle Nerve.*, 15, 14-20.
- Bornemann A, Schmalbruch H. (1993)  
Anti-vimentin staining in muscle pathology.  
*Neuropathol Appl Neurobiol.*, 19, 414-419.
- Bornemann A, Schmalbruch H. (1994)  
Immunocytochemistry of M-cadherin in mature and regenerating rat muscle.  
*Anat Rec.*, 239, 119-125.
- Buonanno A, Apone L, Morasso MI, Beers R, Brenner HR, Eftimie R. (1992)  
The MyoD family of myogenic factors is regulated by electrical activity: isolation and characterization of a mouse Myf-5 cDNA.  
*Nucleic Acids Res.*, 20, 539-544.
- Braun T, Bober E, Winter B, Rosenthal N, Arnold HH. (1990)  
Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12.  
*EMBO J.*, 9, 821-831.

- Braun T, Buschhausen-Denker G, Bober E, Tannich E, Arnold HH. (1989)  
A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts.  
EMBO J., 8, 701-709.
- Cantini M, Carraro U. (1995)  
Macrophage-released factor stimulates selectively myogenic cells in primary muscle culture.  
J Neuropathol Exp Neurol, 54, 121-128.
- Cantini M, Massimino ML, Bruson A, Catani C, Dalla Libera L, Carraro U. (1994)  
Macrophages regulate proliferation and differentiation of satellite cells.  
Biochem Biophys Res Commun., 202, 1688-1696.
- Carraro U, Morale D, Mussini I, Lücke S, Cantini M, Betto R, Catani C, Dalla-Libera L, Betto DD, Noventa D. (1985)  
Chronic denervation of rat hemidiaphragm: maintenance of fiber heterogeneity with associated increasing uniformity of myosin isoforms.  
J Cell Biol, 100, 161-174.
- Cashman NR, Couvalt J, Wollman RL, Sanes JR (1987)  
Neural cell adhesion molecule in normal, denervated, and myopathic human muscle.  
Ann Neurol, 21, 481-489.
- Chevallier A, Kieny M, Mauger A. (1977)  
Limb-somite relationship: origin of the limb musculature.  
J Embryol Exp Morphol., 41, 245-258.
- Chiakulas JJ, Pauly JE. (1965)  
A study of postnatal growth of skeletal muscle in the rat.  
Anat. Rec., 152, 55-62.
- Choi J, Costa ML, Mermelstein CS, Chagas C, Holtzer S, Holtzer H. (1990)  
MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes.  
Proc Natl Acad Sci U S A., 87, 7988-7992.
- Christ B, Jacob HJ, Jacob M. (1977)  
Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos.  
Anat Embryol (Berl)., 150, 171-186.
- Cooper RN, Tajbakhsh S, Mouly V, Cossu G, Buckingham M, Butler-Browne GS. (1999)  
In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle.  
J Cell Sci., 112, 2895-2901.

- Cornelison DD, Wold BJ. (1997)  
Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells.  
Dev Biol., 191, 270-283.
- Cossu G, Cicinelli P, Fieri C, Coletta M, Molinaro M. (1985)  
Emergence of TPA-resistant 'satellite' cells during muscle histogenesis of human limb.  
Exp Cell Res., 160, 403-411.
- Cossu G, Eusebi F, Grassi F, Wanke E. (1987)  
Acetylcholine receptor channels are present in undifferentiated satellite cells but not in embryonic myoblasts in culture.  
Dev Biol., 123, 43-50.
- Cossu G, Molinaro M, Pacifici M. (1983)  
Differential response of satellite cells and embryonic myoblasts to a tumor promoter.  
Dev Biol., 98, 520-524.
- Cossu G, Zani B, Coletta M, Bouche M, Pacifici M, Molinaro M. (1980)  
In vitro differentiation of satellite cells isolated from normal and dystrophic mammalian muscles. A comparison with embryonic myogenic cells.  
Cell Differ., 9, 357-368.
- Coulton GR, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. (1988)  
The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation.  
Neuropathol Appl Neurobiol., 14, 53-70.
- Covault J, Sanes JR. (1985)  
Neural cell adhesion molecule (N-CAM) accumulates in denervated and paralyzed skeletal muscles.  
Proc Natl Acad Sci U S A., 82, 4544-4548.
- Cull-Candy SG, Miledi R, Nakajima Y, Uchitel OD. (1980)  
Visualization of satellite cells in living muscle fibres of the frog.  
Proc R Soc Lond B Biol Sci., 209, 563-568.
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. (1987)  
Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts.  
Cell., 51, 987-1000.
- De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-DeAngelis MG, Ponzetto C, Cossu G. (1999)  
Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration.  
J Cell Biol., 147, 869-878.

- De Maruenda EC, Franzini-Armstrong C. (1978)  
Satellite and invasive cells in frog sartorius muscle.  
*Tissue Cell.*, 10, 749-772.
- Dickson G, Peck D, Moore SE, Barton CH, Walsh FS. (1990)  
Enhanced myogenesis in NCAM-transfected mouse myoblasts.  
*Nature.*, 344, 348-351.
- DiMario JX, Uzman A, Strohman RC. (1991)  
Fiber regeneration is not persistent in dystrophic (MDX) mouse skeletal muscle.  
*Dev Biol.*, 148, 314-321.
- Donalies M, Cramer M, Ringwald M, Starzinski-Powitz A. (1991)  
Expression of M-cadherin, a member of the cadherin multigene family, correlates with differentiation of skeletal muscle cells.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.*, 88, 8024-8028.
- Feldman JL, Stockdale FE. (1992)  
Temporal appearance of satellite cells during myogenesis.  
*Dev Biol.*, 153, 217-226.
- Floss T, Arnold HH, Braun T. (1997)  
A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration.  
*Genes Dev.*, 11, 2040-2051.
- Füchtbauer EM, Westphal H. (1992)  
MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse.  
*Dev Dyn.*, 193, 34-39.
- Gal-Levi R, Leshem Y, Aoki S, Nakamura T, Halevy O. (1998)  
Hepatocyte growth factor plays a dual role in regulating skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation.  
*Biochim Biophys Acta.*, 1402, 39-51.
- Gard DL, Lazarides E. (1980)  
The synthesis and distribution of desmin and vimentin during myogenesis in vitro.  
*Cell.*, 19, 263-275.
- Gibson MC, Schultz E. (1982)  
The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles.  
*Anat Rec.*, 202, 329-337.
- Gibson MC, Schultz E. (1983)  
Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells.  
*Muscle Nerve.*, 6, 574-580.



- Grounds MD. (1998)  
Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration.  
*Ann N Y Acad Sci.*, 854, 78-91.
- Grounds MD, Garrett KL, Lai MC, Wright WE, Beilharz MW. (19992)  
Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes.  
*Cell Tissue Res.*, 267, 99-104.
- Grounds MD, Yablonka-Reuveni Z. (1993)  
Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration.  
*Mol Cell Biol Hum Dis Ser.*, 3, 210-256.
- Gulati AK. (1988)  
Long-term retention of regenerative capability after denervation of skeletal muscle, and dependency of late differentiation on innervation.  
*Anat Rec.*, 220, 429-434.
- Halevy O, Novitch BG, Spicer DB, Skapek SX, Rhee J, Hannon GJ, Beach D, Lassar AB. (1995)  
Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD.  
*Science.*, 267, 1018-1021.
- Hartley RS, Bandman E, Yablonka-Reuveni Z. (1992)  
Skeletal muscle satellite cells appear during late chicken embryogenesis.  
*Dev Biol.*, 153, 206-216.
- Hartley RS, Bandman E, Yablonka-Reuveni Z. (1991)  
Myoblasts from fetal and adult skeletal muscle regulate myosin expression differently.  
*Dev Biol.*, 148, 249-260.
- Hauschka SD. (1974)  
Clonal analysis of vertebrate myogenesis. 3. Developmental changes in the muscle-colony-forming cells of the human fetal limb.  
*Dev Biol.*, 37, 345-368.
- Herrera AA, Banner LR. (1990)  
The use and effects of vital fluorescent dyes: observation of motor nerve terminals and satellite cells in living frog muscles.  
*J Neurocytol.*, 19, 67-83.
- Hess A, Rosner S. (1970)  
The satellite cell bud and myoblast in denervated mammalian muscle fibers.  
*Am J Anat.*, 129, 21-39.

Hinterberger TJ, Sassoon DA, Rhodes SJ, Konieczny SF. (1991)  
Expression of the muscle regulatory factor MRF4 during somite and skeletal myofiber development.  
Dev Biol., 147, 144-156.

Hughes SM, Blau HM. (1990)  
Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development.  
Nature., 345, 350-353.

Husmann I, Soulet L, Gautron J, Martelly I, Barritault D. (1996)  
Growth factors in skeletal muscle regeneration.  
Cytokine Growth Factor Rev., 7, 249-258.

Irintchev A, Zeschnigk M, Starzinski-Powitz A, Wernig A. (1994)  
Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles.  
Dev Dyn., 199, 326-337.

Ishimoto S, Goto I, Ohta M, Kuroiwa Y. (1983)  
A quantitative study of the muscle satellite cells in various neuromuscular disorders.  
J Neurol Sci., 62, 303-314.

Jennische E, Ekberg S, Matejka GL. (1993)  
Expression of hepatocyte growth factor in growing and regenerating rat skeletal muscle.  
Am J Physiol., 265, 122-128.

Jesse TL, LaChance R, Iademarco MF, Dean DC. (1998)  
Interferon regulatory factor-2 is a transcriptional activator in muscle where It regulates expression of vascular cell adhesion molecule-1.  
J Cell Biol., 140, 1265-1276.

Johnson SE, Allen RE. (1995)  
Activation of skeletal muscle satellite cells and the role of fibroblast growth factor receptors.  
Exp Cell Res., 219, 449-453.

Katz FRS. (1961)  
The termination of the afferent nerve fiber in the muscle spindle of the frog.  
Phil Trans Roy Soc Lond, 243, 221-225.

Kitzmann M, Carnac G, Vandromme M, Primig M, Lamb NJ, Fernandez A. (1998)  
The muscle regulatory factors MyoD and myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells.  
J Cell Biol., 142, 1447-1459.

- Knudsen KA, Myers L, McElwee SA. (1990)  
A role for the Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent adhesion molecule, N-cadherin, in myoblast interaction during myogenesis.  
*Exp Cell Res.*, 188, 175-184.
- Koishi K, Zhang M, McLennan IS, Harris AJ. (1995)  
MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers.  
*Dev Dyn.*, 202, 244-254.
- Kurek J, Bower J, Romanella M, Austin L. (1996)  
Leukaemia inhibitory factor treatment stimulates muscle regeneration in the mdx mouse.  
*Neurosci Lett.*, 212, 167-70.
- Kurek JB, Nouri S, Kannourakis G, Murphy M, Austin L. (1996)  
Leukemia inhibitory factor and interleukin-6 are produced by diseased and regenerating skeletal muscle.  
*Muscle Nerve.*, 19, 1291-1301.
- Larocque AA, Politoff AL, Peters A. (1980)  
The visualization of myosatellite cells in normal and denervated muscle: a new light microscopic staining technique.  
*Anat Rec.*, 196, 373-385.
- Lescaudron L, Peltekian E, Fontaine-Perus J, Paulin D, Zampieri M, Garcia L, Parrish E. (1999)  
Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant.  
*Neuromuscul Disord.*, 9, 72-80.
- Lipton BH, Schultz E. (1979)  
Developmental fate of skeletal muscle satellite cells.  
*Science.*, 205, 1292-1294.
- Lu DX, Huang SK, Carlson BM. (1997)  
Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle.  
*Anat Rec.*, 248, 355-365.
- Maier A, Zhou Z, Bornemann A. (2002)  
The expression profile of myogenic transcription factors in satellite cells from denervated rat muscle.  
*Brain Pathol.*, 12, 170-177.
- Maier F, Bornemann A. (1999)  
Comparison of the muscle fiber diameter and satellite cell frequency in human muscle biopsies.  
*Muscle Nerve.*, 22, 578-583.

- Mastaglia FL, Dawkins RL, Papadimitriou JM. (1975)  
Morphological changes in skeletal muscle after transplantation. A light and electron-microscopic study of the initial phases of degeneration and regeneration.  
J Neurol Sci., 25, 227-247.
- Mauro A. (1961)  
Satellite cell of skeletal muscle fibers.  
J Biophys Biochem Cytol, 9, 493-498.
- Mège RM, Goudou D, Diaz C, Nicolet M, Garcia L, Geraud G, Rieger F. (1992)  
N-cadherin and N-CAM in myoblast fusion: compared localisation and effect of blockade by peptides and antibodies.  
J Cell Sci., 103, 897-906.
- Megeney LA, Rudnicki MA. (1995)  
Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors.  
Biochem Cell Biol., 73, 723-732.
- Merly F, Lescaudron L, Rouaud T, Crossin F, Gardahaut MF. (1999)  
Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation.  
Muscle Nerve., 22, 724-732.
- Mezzogiorno A, Coletta M, Zani BM, Cossu G, Molinaro M. (1993)  
Paracrine stimulation of senescent satellite cell proliferation by factors released by muscle or myotubes from young mice.  
Mech Ageing Dev., 70, 35-44.
- Miner JH, Wold B. (1990)  
Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes.  
Proc Natl Acad Sci U S A., 87, 1089-1093.
- Moll C, Bornemann A. (2001)  
Neuromuskuläres System.  
In: Böcker W, Denk H, Heitz PU.: Pathologie.  
2. Aufl., Urban und Fischer, München Jena.
- Moss FP, Leblond CP. (1971)  
Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats.  
Anat Rec., 170, 421-435.
- Muir AR, Kanji AH, Allbrook D. (1965)  
The structure of the satellite cells in skeletal muscle.  
J Anat., 99, 435-444.
- Murray MA, Robbins N. (1982a)  
Cell proliferation in denervated muscle: time course, distribution and relation to disuse.  
Neuroscience, 7, 1817-1822.

- Murray MA, Robbins N. (1982b)  
Cell proliferation in denervated muscle: identity and origin of dividing cells.  
*Neuroscience*, 7, 1823-1833.
- Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. (1999)  
IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with  
GATA-2 and NF-ATc1.  
*Nature.*, 400, 581-585.
- Oertel G. (1988)  
Morphometric analysis of normal skeletal muscles in infancy, childhood and  
adolescence. An autopsy study.  
*J Neurol Sci.*, 88, 303-313.
- Okada S, Nonaka I, Chou SM. (1984)  
Muscle fiber type differentiation and satellite cell populations in normally grown and  
neonatally denervated muscles in the rat.  
*Acta Neuropathol (Berl)*, 65, 90-98.
- Ontell M. (1975)  
Evidence for myoblastic potential of satellite cells in denervated muscle.  
*Cell Tissue Res.*, 160, 345-353.
- Orimo S, Hiyamuta E, Arahata K, Sugita H. (1991)  
Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced  
myonecrosis.  
*Muscle Nerve*, 14, 515-520.
- Ott MO, Bober E, Lyons G, Arnold H, Buckingham M. (1991)  
Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal  
muscle in the mouse embryo.  
*Development.*, 111, 1097-1107.
- Perry RL, Rudnick MA. (2000)  
Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation.  
*Front Biosci.*, 5, 750-767.
- Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. (1995)  
Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating  
skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells.  
*Lab Invest.*, 72, 341-347.
- Reznik M. (1969)  
Origin of myoblasts during skeletal muscle regeneration. Electron microscopic  
observations.  
*Lab Invest.*, 20, 353-363.

- Rhodes SJ, Konieczny SF. (1989)  
Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family.  
*Genes Dev.*, 3, 2050-2061.
- Rieger F, Grumet M, Edelman GM (1985)  
N-CAM at the vertebrate neuromuscular junction.  
*J. Cell Biol.*; 101; 285-293.
- Rodrigues A de C, Schmalbruch H. (1995)  
Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles.  
*Anat Rec.*, 243, 430-437.
- Rosen GD, Sanes JR, LaChance R, Cunningham JM, Roman J, Dean DC. (1992)  
Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis.  
*Cell.*, 69, 1107-1119.
- Rosenblatt JD, Yong D, Parry DJ. (1994)  
Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle.  
*Muscle Nerve.*, 17, 608-613.
- Rudnicki MA, Jaenisch R. (1995)  
The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis.  
*Bioessays.*, 17, 203-209.
- Russell B, Dix DJ, Haller DL, Jacobs-El J. (1992)  
Repair of injured skeletal muscle: a molecular approach.  
*Med Sci Sports Exerc.*, 24, 189-196.
- Rutishauser U. (1984)  
Developmental biology of a neural cell adhesion molecule.  
*Nature.*, 310, 549-554.
- Sassoon DA, Lyons G, Wright WE, Lin V, Lassar A, Weintraub H, Buckingham M. (1989)  
Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis.  
*Nature.*, 341, 303-307.
- Sassoon DA. (1993)  
Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis.  
*Dev Biol.*, 156, 11-23.
- Schmalbruch H. (1976)  
The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat.  
*Tissue Cell.*, 8, 673-692.

- Schmalbruch H. (1978)  
Satellite cells of rat muscles as studied by freeze-fracturing.  
*Anat Rec.*, 191, 371-376.
- Schmalbruch H, Hellhammer U. (1976)  
The number of satellite cells in normal human muscle.  
*Anat Rec.*, 185, 279-287.
- Schmalbruch H, Lewis DM. (1994)  
A comparison of the morphology of denervated with aneurally regenerated soleus muscle of rat.  
*J Muscle Res Cell Motil.*, 15, 256-266.
- Schultz E. (1974)  
A quantitative study of the satellite cell population in postnatal mouse lumbrical muscle.  
*Anat Rec.*, 180, 589-595.
- Schultz E. (1976)  
Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle.  
*Am J Anat.*, 147, 49-70.
- Schultz E, Albright DJ, Jaryszak DL, David TL. (1988)  
Survival of satellite cells in whole muscle transplants.  
*Anat Rec.*, 222, 12-17.
- Schultz E, Gibson MC, Champion T. (1978)  
Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study.  
*J Exp Zool.*, 206, 451-456.
- Schultz E, Jaryszak DL, Gibson MC, Albright DJ. (1986)  
Absence of exogenous satellite cell contribution to regeneration of frozen skeletal muscle.  
*J Muscle Res Cell Motil.*, 7, 361-367.
- Schultz E, Jaryszak DL, Valliere CR. (1985)  
Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury.  
*Muscle Nerve*, 8, 217-222.
- Schultz E, Lipton BH. (1982)  
Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age.  
*Mech Ageing Dev.*, 20, 377-383.
- Schultz E, McCormick KM. (1994)  
Skeletal muscle satellite cells.  
*Rev Physiol Biochem Pharmacol.*, 123, 213-257.

- Seale P, Rudnicki MA. (2000)  
A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells.  
*Dev Biol.*, 218, 115-124.
- Senni MI, Castrignano F, Poiana G, Cossu G, Scarsella G, Biagioni S. (1987)  
Expression of adult fast pattern of acetylcholinesterase molecular forms by mouse satellite cells in culture.  
*Differentiation.*, 36, 194-198.
- Sheehan SM, Allen RE. (1999)  
Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor.  
*J Cell Physiol.*, 181, 499-506.
- Skapek SX, Rhee J, Spicer DB, Lassar AB. (1995)  
Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase.  
*Science.*, 267, 1022-1024.
- Snow MH. (1977)  
The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats.  
*Cell Tiss. Res.*, 185, 399-408.
- Snow MH. (1983)  
A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse.  
*Anat Rec.*, 207, 593-604.
- Smith CK 2nd, Janney MJ, Allen RE. (1994)  
Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells.  
*J Cell Physiol.*, 159, 379-385.
- Stefanini M, De Martino C, Zamboni L. (1967)  
Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy.  
*Nature*, 216, 173-174.
- Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. (1998)  
HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells.  
*Dev Biol.*, 194, 114-128.
- Terasawa K. (1986)  
Muscle regeneration and satellite cells in Fukuyama type congenital muscular dystrophy.  
*Muscle Nerve.*, 9, 465-470.



- Tidball JG. (1995)  
Inflammatory cell response to acute muscle injury.  
*Med Sci Sports Exerc.*, 27, 1022-1032.
- Vaidya TB, Rhodes SJ, Taparowsky EJ, Konieczny SF. (1989)  
Fibroblast growth factor and transforming growth factor beta repress transcription of the myogenic regulatory gene MyoD1.  
*Mol Cell Biol.*, 9, 3576-3579.
- Vater R, Cullen MJ, Harris JB. (1994)  
The expression of vimentin in satellite cells of regenerating skeletal muscle in vivo.  
*Histochem J.*, 26, 916-928.
- Viguie CA, Lu DX, Huang SK, Rengen H, Carlson BM. (1997)  
Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat.  
*Anat Rec.*, 248, 346-354.
- Voytik SL, Przyborski M, Badylak SF, Konieczny SF. (1993)  
Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles.  
*Dev Dyn.*, 198, 214-224.
- Wakayama Y. (1976)  
Electron microscopic study on the satellite cell in the muscle of Duchenne muscular dystrophy.  
*J Neuropathol Exp Neurol.*, 35, 532-340.
- Wakayama Y, Schotland DL, Bonilla E, Orecchio E. (1979)  
Quantitative ultrastructural study of muscle satellite cells in Duchenne dystrophy.  
*Neurology.*, 29, 401-407.
- Walters EH, Stickland NC, Loughna PT. (2000)  
The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes.  
*J Muscle Res Cell Motil.*, 21, 647-653.
- Watkins SC, Cullen MJ. (1986)  
A quantitative comparison of satellite cell ultrastructure in Duchenne muscular dystrophy, polymyositis and normal controls.  
*Muscle Nerve*, 9, 724-730.
- Watkins SC, Cullen MJ. (1988)  
A quantitative study of myonuclear and satellite cell nuclear size in Duchenne's muscular dystrophy, polymyositis and normal human skeletal muscle.  
*Anat Rec.*, 222, 6-11.

Watt DJ, Lambert K, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. (1982)  
Incorporation of donor muscle precursor cells into an area of muscle regeneration in the host mouse.  
*J Neurol Sci.*, 57, 319-331.

Watt DJ, Morgan JE, Clifford MA, Partridge TA. (1987)  
The movement of muscle precursor cells between adjacent regenerating muscles in the mouse.  
*Anat Embryol (Berl.)*, 175, 527-536.

Webster C, Blau HM. (1990)  
Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy.  
*Somat Cell Mol Genet.*, 16, 557-565.

Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB, Miller AD. (1989)  
Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.*, 86, 5434-5438.

Weis J. (1994)  
Jun, Fos, MyoD1, and myogenin proteins are increased in skeletal muscle fiber nuclei after denervation.  
*Acta Neuropathol (Berl.)*, 87, 63-70.

Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. (1989)  
Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD.  
*Cell.*, 56, 607-617.

Yablonka-Reuveni Z, Nameroff M. (1990)  
Temporal differences in desmin expression between myoblasts from embryonic and adult chicken skeletal muscle.  
*Differentiation.*, 45, 21-28.

Yablonka-Reuveni Z, Quinn LS, Nameroff M. (1987)  
Isolation and clonal analysis of satellite cells from chicken pectoralis muscle.  
*Dev Biol.*, 119, 252-259.

Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ. (1994)  
Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers.  
*Dev Biol.*, 164, 588-603.

Yagami-Hiromasa T, Sato T, Kurisaki T, Kamijo K, Nabeshima Y, Fujisawa-Sehara A. (1995)  
A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion.  
*Nature.*, 377, 652-656.

Yang JT, Rando TA, Mohler WA, Rayburn H, Blau HM, Hynes RO. (1996)  
Genetic analysis of alpha 4 integrin functions in the development of mouse skeletal muscle.  
J Cell Biol., 135, 829-835.

Zeschnigk M, Kozian D, Kuch C, Schmoll M, Starzinski-Powitz A. (1995)  
Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells.  
J Cell Sci., 108, 2973-2981.

Zhou Z, Bornemann A. (2001)  
MRF4 protein expression in regenerating rat muscle.  
J Muscle Res Cell Motil., 22, 311-316.

Mein Dank gilt:

- Fr. PD Dr. med. A. Bornemann für die Themenstellung und die wissenschaftliche Betreuung.
- Herrn Prof. Dr. med. R. Meyermann für die zur Verfügungsstellung der Räume und Geräte.
- Herrn Prof. Dr. med. U.-P. Ketelsen, Universitätskinderklinik Freiburg, für die zur Verfügungsstellung von Räumen und Präparaten in der Vorbereitungsphase der Arbeit.
- Fr. B. Frank für Hilfe bei der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit.
- Herrn Dr. med. H. Strik und Herrn Dr. med. R. Beschorner für die Hilfe bei der computerunterstützten Auszählung.
- Herrn Dr. M. Eichner, Institut für Medizinische Biometrie, für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.
- allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Hirnforschung, die zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

## Lebenslauf

Name	Sandra Conzelmann
Geburtstag	16. Mai 1976
Geburtsort	Albstadt-Ebingen
1982-1986	Grundschule Albstadt-Onstmettingen
1986-1992	Progymnasium Albstadt-Tailfingen
1992-1995	Gymnasium Albstadt-Ebingen
Juni 1995	Allgemeine Hochschulreife
Oktober 1995	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
September 1997	Ärztliche Vorprüfung
August 1998	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 1998	Beginn der Dissertation bei Fr. PD Dr. med. A. Bornemann am Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen. Titel: „Regenerationsverhalten humaner Skelettmuskulatur bei neurogenen und myopathischen Muskelerkrankungen“
September 2001	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2001 bis August 2002	Praktisches Jahr am Kreiskrankenhaus Sigmaringen und am Kantonsspital Nidwalden in Stans (Schweiz)
November 2002	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung