

Aus dem Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. Meyermann

**Denervation und Reinnervation in humanen
Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Kathrin Janina Doppler

aus

Ludwigsburg

2009

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Frau Professor Dr. A. Bornemann

2. Berichtstatter: Professor Dr. P. Ruck

1. Einleitung	7
1.1 Myogenese	8
1.2 Regeneration	10
1.3 Denervation.....	13
1.3.1 Morphologische Veränderungen in denervierter Muskulatur.....	13
1.3.2 Veränderung der Genexpression durch Denervation.....	17
1.3.3 Immunhistochemische Denervationsmarker	17
1.3.3.1 Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)	18
1.3.3.1.1 Struktur, Vorkommen und Funktion von NCAM	18
1.3.3.1.2 Expression von NCAM nach Denervation	20
1.3.3.2 Neonatale Isoform des Myosin Heavy Chain-Moleküls (MHCn)	22
1.3.3.2.1 Struktur, Vorkommen und Funktion von MHCn.....	22
1.3.3.2.2 Expression von MHCn nach Denervation	23
1.3.3.3 Tenascin	25
1.3.3.3.1 Struktur, Vorkommen und Funktion von Tenascin	25
1.3.3.3.2 Expression von Tenascin nach Denervation.....	27
1.3.3.4 Myogene regulatorische Faktoren (MRFs).....	28
1.3.3.4.1 Struktur, Vorkommen und Funktion der MRFs.....	28
1.3.3.4.2 Expression von MyoD und Myogenin nach Denervation.....	29
1.3.4 Reinnervation.....	31
1.3.4.1 Einfluss der Reinnervation auf durch Denervation hervorgerufene morphologische Veränderungen.....	32
1.3.4.2 Einfluss der Reinnervation auf die Expression von Denervationsmarkern....	32
1.3.4.3 Einfluss von Reinnervation auf die Genexpression.....	33
1.3.5 Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie.....	34
1.4 Ziel der Arbeit.....	38

2. Material und Methoden	39
2.1 Auswahl der Muskelbiopsien.....	39
2.1.1 Patienten.....	39
2.2 Immunhistochemische Färbungen	43
2.2.1 Grundprinzip der immunhistochemischen Färbungen nach der ABC-Methode.....	43
2.2.2 Primärantikörper	44
2.2.3 Sekundärantikörper.....	46
2.2.4 Herstellung der Schnitte.....	47
2.2.5 Kontrollen.....	47
2.2.5.1 Negativkontrolle	47
2.2.5.2 Positivkontrolle	47
2.2.5.3 Färbung mit Anti-Vimentin.....	48
2.2.5.4 Färbung mit Anti-MHCs.....	48
2.2.6 Vorgehensweise bei den immunhistochemischen Färbungen	49
2.4 Auswertung	52
2.4.1 Analyse der immunhistochemisch positiven Fasern	52
2.4.2 Statistik	53
3. Ergebnisse	54
3.1 Morphologische Beobachtungen.....	54
3.2 Angulär-atrophe Fasern	56
3.2.1 Vergleich der durchschnittlichen Menge an positiven angulär-atropen Fasern und der Häufigkeitsverteilung für die verschiedenen Marker (NCAM, MHCn, Myogenin).....	56
3.2.1.1 NCAM	56
3.2.1.2 MHCn.....	56
3.2.1.3 Myogenin	59

3.2.2 Vergleich der Menge an positiven angulär-atrophen Fasern in den einzelnen Biopsien für die verschiedenen Marker (NCAM, MHCn, Myogenin)	63
3.2.2.1 Biopsien mit mehr MHCn-positiven angulär-atrophen Fasern als NCAM-positiven angulär-atrophen Fasern	69
3.2.2.2 Biopsien mit mehr NCAM-positiven angulär-atrophen Fasern als MHCn-positiven angulär-atrophen Fasern	71
3.2.2.3 Biopsien mit etwa gleich viel NCAM- und MHCn-positiven angulär-atrophen Fasern.....	72
3.3 Verteilungsmuster der einzelnen Marker	73
3.3.1 Verteilung der für die einzelnen Marker positiven Fasern auf dem gesamten Schnitt	73
3.3.2 Vorkommen der einzelnen Markern in Feldern mit kleinen Fasern	74
3.3.3 Vorkommen der einzelnen Marker in Feldern mit angulär-atrophen Fasern	75
3.4 Kleine Fasern.....	79
3.4.1 Vergleich der durchschnittlichen Menge an positiven kleinen Fasern und der Häufigkeitsverteilung für die verschiedenen Marker (NCAM, MHCn, Myogenin).....	80
3.4.1.1 NCAM	80
3.4.1.2 MHCn.....	81
3.4.1.3 Myogenin	85
3.4.2 Vergleich der Menge an positiven kleinen Fasern in den einzelnen Biopsien für die verschiedenen Marker (NCAM, MHCn, Myogenin)	86
3.4.3 Vergleich der Menge der für die einzelnen Marker positiven kleinen Fasern in Biopsien mit verschiedener Menge an kleinen Fasern.....	91
3.5 Normal große Fasern.....	94
3.5.1 Vergleich der durchschnittlichen Menge an positiven normal großen Fasern und der Häufigkeitsverteilung für die verschiedenen Marker (NCAM, MHCn, Myogenin).....	95
3.5.1.1 NCAM	95
3.2.1.2 MHCn.....	96

3.2.1.3 Myogenin	96
3.5.2 Vergleich der Menge an positiven normal großen Fasern in den einzelnen Biopsien für die verschiedenen Marker (NCAM, MHCn, Myogenin)	98
3.5.3 Vergleich der Biopsien nach der Menge ihrer NCAM- und MHCn-positiven normal großen Fasern	104
3.5.4 Biopsien mit 0% positiven normal großen Fasern.....	107
3.6 Tenascin	108
3.6.1 Menge und Verteilung von Tenascin.....	108
3.6.2 Tenascin in „chronischen“ und „akuten“ Fällen	110
3.7 Vergleich der Menge der für einen Marker positiven kleinen Fasern, angulär-atrophen Fasern und normal großen Fasern	111
3.7.1 Vergleich der durchschnittlichen Mengen an positiven kleinen, angulär-atrophen und normal großen Fasern für die verschiedenen Marker	111
3.7.2 Vergleich der Mengen an positiven kleinen, angulär-atrophen und normal großen Fasern für die verschiedenen Marker in den einzelnen Biopsien	111
3.7.2.1 Myogenin	111
3.7.2.2 NCAM	116
3.7.2.3 MHCn.....	120
4. Diskussion.....	125
4.1 Morphologische Veränderungen	125
4.2 Angulär-atrophe Fasern	126
4.3 Kleine Fasern.....	129
4.4 Normal große Fasern.....	133
4.6 Tenascin	136
4.7 Vergleich mit den Ergebnissen früherer Versuche an humanen Muskelbiopsien	139
5. Zusammenfassung	142
6. Literaturverzeichnis.....	145

1. Einleitung

In adulter Skelettmuskulatur ist die Myogenese in der Regel abgeschlossen. Die Muskelfasern liegen als mehrkerniges Synzytium vor und die Kerne sind nicht mehr teilungsfähig. Dennoch kann es auch im adulten Muskel dazu kommen, dass Gene aufreguliert werden, die in der Embryonalentwicklung eine Rolle spielen, und embryonale Proteine exprimiert werden. Kommt es zur Verletzung von Muskulatur, so werden ähnlich wie in der Embryonalentwicklung neue Muskelfasern gebildet. Dabei werden zahlreiche Proteine exprimiert, die normalerweise in der fetalen Myogenese vorkommen. Auch bei Denervation kommt es zur Aufregulierung von embryonalen Genen und Proteinen. Diese können immunhistochemisch als Marker für Denervation benutzt werden. Dabei muss man jedoch beachten, dass es keinen Marker gibt, der spezifisch für Denervation ist. Vielmehr werden bei Denervation Proteine aus der Embryonalentwicklung exprimiert, die auch Regenerationsvorgänge anzeigen können. Die fetale Myogenese und der Ablauf von Regeneration sind daher Grundlage für das Verständnis des Expressionsmuster von Denervationsmarkern, wie NCAM, MyoD, Myogenin und Tenascin.

1.1 Myogenese

Die Skelettmuskulatur der Wirbeltiere entwickelt sich aus dem paraxialen Mesoderm. Durch Segmentierung entstehen hieraus beidseits des Neuralrohres die Somiten (Christ et al., 1977; Christ und Ordahl, 1995). Aus dem ventralen Teil der Somiten entwickelt sich das Sklerotom, woraus der Knorpel und die Knochen der Wirbelsäule und Rippen entstehen (Buckingham et al., 2003). Der dorsale Teil bildet das Dermomyotom, woraus sich Haut und Muskulatur des Rückens bilden. Die Extremitätenmuskulatur entsteht durch das Auswandern von Muskelprogenitorzellen aus dem Epithel des hypaxialen Dermomyotoms in Richtung Extremitäten (Buckingham, 2001). Sowohl für die Ablösung dieser Zellen aus den Somiten als auch für die Migration wird c-met benötigt. Bei c-met handelt es sich um einen Tyrosinkinaserzeptor, welcher an das HGF von

mesodermalen Zellen bindet und so die Migrationsroute beeinflusst (Dietrich et al., 1999). Für die Expression des c-met-Gens wird als Transkriptionsfaktor Pax3 benötigt. Ein weiterer für die Migration nötiger Transkriptionsfaktor ist Lbx1 (Schäfer und Braun, 1999). Nach Erreichen der Extremitäten beginnen die migrierten Zellen MyoD und Myf5 zu exprimieren (Tajbakhsh und Buckingham, 1994). Die Expression von MyoD und Myf5 ist dabei abhängig von Mox2 (Myf5) bzw. Six 1 und 4 (MyoD) (Mankoo et al., 1999; Relaix und Buckingham, 1999). Unter Expression von Myf5 und MyoD werden die multipotenten Vorläuferzellen zu myogen determinierten Myoblasten und proliferieren (Perry und Rudnick, 2000). Für die Aktivierung des Differenzierungsprogrammes sind Myogenin, Mef2 und andere Differenzierungsfaktoren nötig (Buckingham et al., 2003). Die Myoblasten treten aus dem Zellzyklus aus und bilden unter Einfluss von Myogenin und MRF4 mehrkernige Synzytien, sogenannte Myotuben. Diese differenzieren weiter zu Muskelfasern (Buckingham et al., 2003; Chargé und Rudnicki, 2004).

Neben Muskelfasern liegen in adulter Skelettmuskulatur auch Satellitenzellen vor. Dies sind spindelförmige Zellen mit zentralem Kern und wenig Zytoplasma. Sie liegen der Muskelfaseroberfläche dicht an und werden mit dieser von einer gemeinsamen Basalmembran umgeben (Bischoff und Franzini-Armstrong, 2004) (Abbildung 1). Hinsichtlich ihrer Herkunft existieren zwei Hypothesen (Chargé und Rudnicki, 2004): Nach der Hypothese des somitischen Ursprungs entwickeln sich Satellitenzellen während der Embryogenese aus der gleichen Zelllinie wie embryonale Muskelzellen (Armand et al., 1983; Wagers und Conboy, 2005). Eine andere Hypothese geht von einer endothelialen Herkunft der Satellitenzellen aus (De Angelis et al., 1999). Ergebnisse von verschiedenen Arbeitsgruppen in den letzten Jahren unterstützen jedoch eher die erste Hypothese (Gros et al., 2005; Relaix et al., 2005). Trotz des noch nicht hinreichend geklärten embryologischen Ursprungs wurde Pax7 als das Gen identifiziert, das für die Spezifizierung der Vorläuferzellen zu Satellitenzellen verantwortlich ist (Seale et al., 2000). Die neu entstehenden Satellitenzellen proliferieren zunächst, treten dann aus dem Zellzyklus aus und gehen in einen Ruhezustand in der G₀-Phase des Zellzyklus über (Bischoff und Franzini-

Armstrong, 2004). In Abbildung 2 ist der Ablauf der Myogenese graphisch dargestellt.

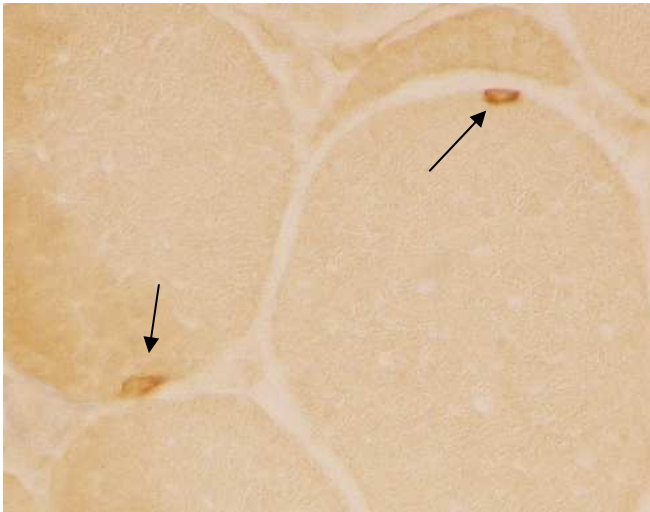


Abbildung 1: Färbung mit Anti-NCAM: Es sind zwei Satellitenzellen (Pfeile) zu erkennen. Man sieht deutlich, dass diese der zugehörigen Muskelfaser eng anliegen.

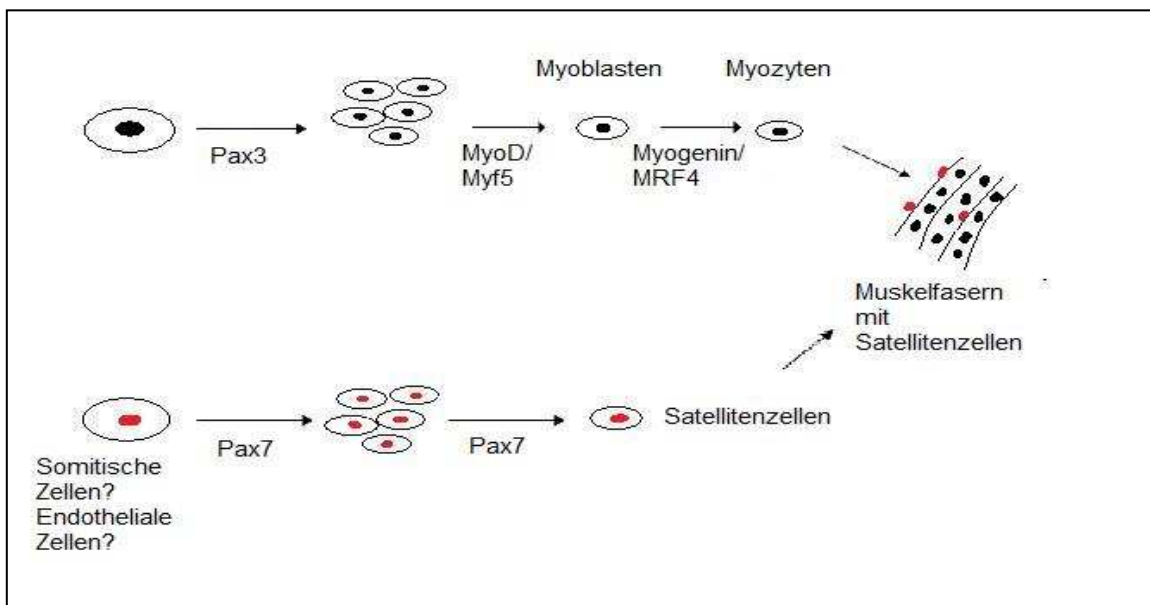


Abbildung 2: Embryonale Myogenese: Pax3 führt zur Proliferation von mesodermalen somitschen Zellen, Myf5 und MyoD induzieren die Determination dieser Zellen zur myogenen Zelllinie, es entstehen Myoblasten. Myogenin und MRF4 bewirken die terminale Differenzierung der Myoblasten zu Myozyten. Durch Fusion von Myozyten entstehen multinukleäre Muskelfasern. Eine Myoblastenpopulation, deren Herkunft noch nicht eindeutig geklärt ist, proliferiert unter Einfluss von Pax7 und bildet Satellitenzellen, die mit den Muskelfasern fusionieren, in einen undifferenzierten Ruhezustand übergehen und dem Muskelfaserwachstum und der Regenerationsfähigkeit dienen. Modifiziert nach Chargé und Rudnicki, 2004.

Zunächst tritt nur embryonales MHC auf. Perinatal werden sowohl embryonales als auch neonatales MHC (MHCn). Postnatal geht zunächst die Expression von embryonalem MHC zurück, danach sinkt auch MHCn ab. Parallel zum Absinken des embryonalen und neonatalen MHC steigt das adulte MHC an (Whalen et al., 1981; Bandman et al., 1982) Die langsame Isoform des adulten MHC wird in der Maus schon bei Geburt exprimiert Die adulten schnellen Isoformen MHCIIA, MHCIIIB und MHCIIIX/IID können in den meisten Muskeln der Maus ab dem siebten Tag nach Geburt nachgewiesen werden. Das embryonale MHC ist noch sieben Tage nach Geburt nachweisbar, MHCn in den meisten Muskeln noch drei Wochen, im M. masseter sogar noch drei Monate lang (Agbulut et al., 2003). Beim Menschen ist MHCn bis einen Monat postnatal nachweisbar (Fitzsimons und Hoh, 1981).

Das Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) wird in der Myogenese schon vor dem Auftreten von Myosin exprimiert und kann schon im Myotom noch vor der Innervation nachgewiesen werden (Covault und Sanes, 1986). Weiterhin ist es auf der Zelloberfläche von Myoblasten und Myotuben nachweisbar (Moore und Walsh, 1985; Covault und Sanes, 1986). Innerhalb der zweiten postnatalen Woche verschwindet NCAM von der Zelloberfläche und liegt im adulten Muskel nur noch an den motorischen Endplatten und auf der Oberfläche von Satellitenzellen vor (Moore und Walsh, 1985; Covault und Sanes, 1986) (Abbildung 1). In Myoblasten liegen vor allem NCAM-Isoformen mit einem Molekulargewicht von 140 und 145 kDa vor, in Myotuben hauptsächlich die 125kDa- und die 155kDa-Isoform (Covault et al., 1986; Moore et al., 1987).

1.2 Regeneration

Adulte Skelettmuskulatur besitzt die Fähigkeit, nach Verletzung zu regenerieren. Erste Aufzeichnungen hierzu entstanden bereits in der zweiten Hälfte des 18. Jahrhunderts. Im 19. Jahrhundert durchgeführte Untersuchungen konnten eine starke Regenerationsfähigkeit von Muskulatur nach chemischer und physikalischer Verletzung zeigen (Grounds, 1991).

Bei den meisten Formen von Verletzung bleibt die Basalmembran der Muskelfaser intakt. Sie dient den neu wachsenden Myotuben als Orientierung und unterstützt deren Wachstum und Reinnervation (Vracko und Benditt, 1972, Bischoff und Franzini-Armstrong, 2004). Doch auch bei Zerstörung der Basalmembran ist Regeneration möglich (Grounds, 1991). Die Verletzung der Plasmamembran bewirkt einen Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels und eine Aktivierung des Komplementsystems, wodurch Nekrose induziert wird und es zu einer Lyse der Muskelzellen kommt (Engel und Biesecker, 1982; Grounds, 1991). Der verletzte Anteil des Muskels wird vom intakten Anteil durch Membranbildung abgegrenzt (Papadimitriou et al., 1990).

Eine wichtige Voraussetzung für das Einsetzen von Regenerationsvorgängen ist der Abbau von nekrotischem Gewebe durch Phagozytose (Grounds, 1987). Durch den veränderten Calciumspiegel und das aktivierte Komplementsystem werden Leukozyten angelockt (Grounds, 1991). Drei Stunden nach Verletzung treten polymorphkernige Leukozyten auf, nach sechs Stunden Makrophagen (Papadimitriou et al., 1990). Diese sezernieren ebenso wie Endothelzellen bei Sauerstoffmangel Angiogenesefaktoren, wie FGF (fibroblast growth factor), wodurch es zur Revaskularisation des regenerierenden Muskels kommt (Knighton et al., 1983; Klagsbrun, 1989, Grounds, 1991).

Die für Regeneration nötigen Muskelvorläuferzellen entstehen aus Satellitenzellen (Bischoff, 1975). Zwar können auch einige nicht-myogene Stammzellen, wie beispielsweise hämatopoetische Stammzellen und Mesangioblasten, zur Regeneration beitragen, doch spielen diese eine untergeordnete Rolle (Ferrari et al., 1998; Minasi et al., 2002; Palacios und Puri, 2006). Die Aktivierung und Differenzierung von Satellitenzellen bei Regeneration weist einige Parallelen zur embryonalen Muskelentwicklung auf. Nach Verletzung führen verschiedene Faktoren dazu, dass die ruhenden Satellitenzellen aktiviert werden, in die G₁-Phase des Zellzyklus eintreten und proliferieren. Zu diesen Faktoren zählen Veränderungen der Extrazellulärmatrix, Wachstumsfaktoren, Hormone und die Ausbildung von Rezeptoren für diese

(Florini, 1987; Florini und Magri, 1989; Grounds, 1991; Dhawan und Rando, 2005).

Sie beginnen skelettmuskelspezifische Gene zu exprimieren (Clegg et al., 1987; Grounds, 1991). Es kommt zunächst zur Aufregulierung von Myf5 und MyoD. Nach der Proliferationsphase folgt die terminale Differenzierung unter Expression von Myogenin und MRF4. Das Protein p21 bewirkt einen Austritt aus dem Zellzyklus (Chargé und Rudnicki, 2004). Schließlich kommt es zu einer Fusion der Muskelvorläuferzellen zu Myotuben (Grounds, 1991). Auch die Differenzierung der Muskelvorläuferzellen und ihre Fusion zu Myotuben wird durch die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix, Wachstumsfaktoren und Moleküle an der Zelloberfläche der Vorläuferzellen gefördert (Walsh und Ritter, 1981; Florini und Magri, 1989). Nach der Fusion zu Myotuben kommt es zu einer Reorganisation des Zytoskeletts und der kontraktilen Elemente (Grounds, 1991; Bischoff und Franzini-Armstrong, 2004). Durch Fusion mit weiteren Myoblasten und der Zunahme der Zellkernzahl entstehen Muskelfasern (Wagers und Conboy, 2005). Abbildung 3 zeigt den Ablauf der einzelnen Vorgänge der Regeneration.

Einige aktivierte Satellitenzellen werden nach Proliferation und Austritt aus dem Zellzyklus erneut zu ruhenden Satellitenzellen und bewirken somit eine Selbsterneuerung des Satellitenzellpools (Zammit et al., 2004; Relaix, 2006).

In Muskelbiopsien können regenerierende Fasern anhand verschiedener Merkmale erkannt werden. In der HE-Färbung zeigen sie ein basophiles Zytoplasma, was durch Ribosomen, die kontraktile Elemente bilden, hervorgerufen wird. Desweiteren findet man zahlreiche subsarkolemmale Zellkerne und auffällig große dunkle Nukleoli (Banker und Engel, 2004). Immunhistochemisch lassen sich regenerierende Fasern durch Antikörper gegen Vimentin, Desmin, NCAM, Thrombomodulin, Midkin, MHC-I und MHCn anfärben (Bornemann und Schmalbruch, 1992; Niiyama et al., 1999; Banker und Engel, 2004). Je nach Größe der Läsion kommt es zur Proliferation von Bindegewebe (Banker und Engel, 2004).

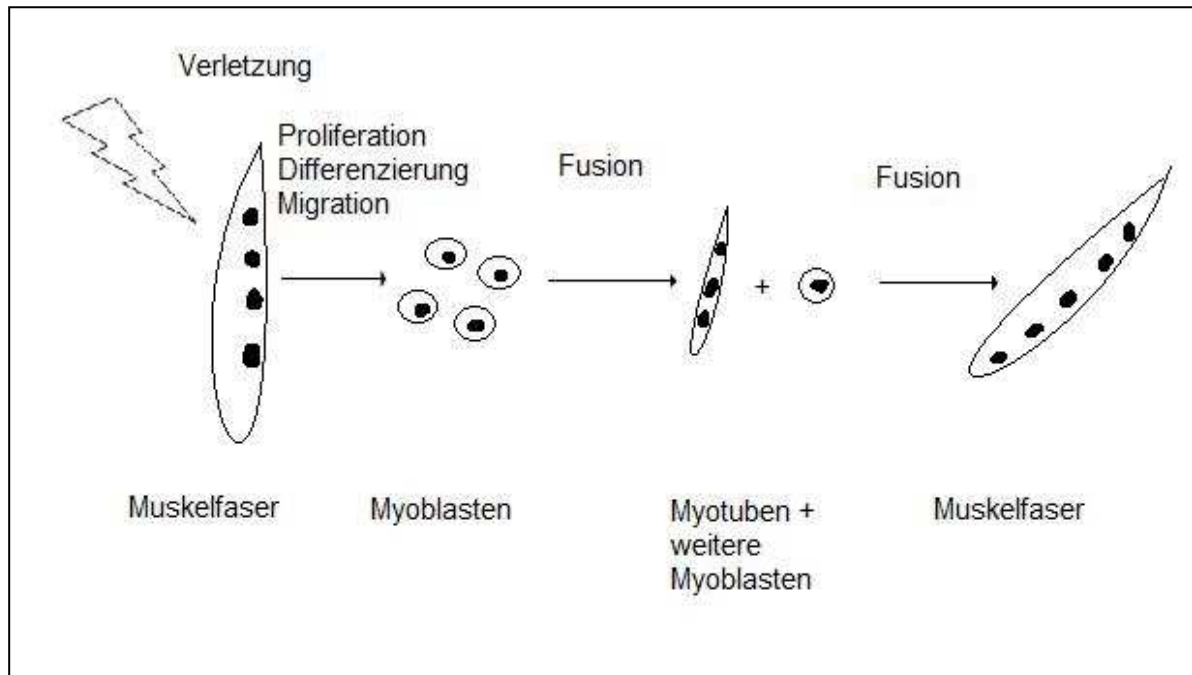


Abbildung 3: Regeneration von Skelettmuskulatur: Nach Verletzung kommt es zur Proliferation, Migration und Differenzierung von Satellitenzellen zu Myoblasten. Durch Fusion von Myoblasten entstehen Myotuben. Die Myotuben fusionieren mit weiteren Myoblasten. Mit Zunahme der Zellkernanzahl entstehen schließlich reife Muskelfasern. Modifiziert nach Wagers und Conboy, 2005.

1.3 Denervation

1.3.1 Morphologische Veränderungen in denervierter Muskulatur

Schon Ende des 19. Jahrhunderts und zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden erste Denervationsexperimente an Tieren durchgeführt. Die erste Untersuchung von Denervation über einen längeren Zeitraum erfolgte jedoch erst 1935 durch Sarah Tower, die erstmals Atrophie, Degeneration und Fibrose in denervierten Muskeln der Katze beschrieb. Gutmann konnte 1948 am Kaninchen beobachten, dass Denervation zu einem zunehmenden Gewichtsverlust des denervierten Muskels führt und mit einer zunehmenden Abnahme des Muskelfaserdurchmessers einhergeht (Midrio, 2006).

Die Muskelmasse unterliegt nach Denervation einer Reduktion (Lewis, 1972; Al-Ahood und Lewis, 1989; Ashley et al., 2007). Es kommt zu einer Atrophie von Muskelfasern (Miledi und Slater, 1969; Anzil und Wernig, 1989; Schmalbruch et al., 1991; Schmalbruch und Lewis, 1994; Ashley et al., 2007). Typ-II-Fasern sind davon früher betroffen als Typ-I-Fasern (Gauthier und Dunn, 1973; Al-Ahood und Lewis, 1989; Lu et al., 1997). Desweiteren kommt es nach Denervation zu einer Dissoziation der Muskelfasern von ihrer kapillären Versorgung und zu einer Reduktion des Verhältnisses von Kapillaren zu Muskelfasern sowie zu einer verringerten Genexpression von Angiogenesefaktoren (Borisov et al., 2000a; Viguie et al., 1997; Wagatsuma und Osawa, 2006), zu einem Verlust von Muskelfaserkernen (Viguie et al., 1997; Schmalbruch et al., 2000), zu einer Verringerung des Durchmessers von Muskelfaserkernen (de Castro Rodrigues et al., 2006) und zur Reduktion der Muskelfasermenge (Anzil und Wernig, 1989) sowie zur Vermehrung des interstitiellen Bindegewebes und zur Proliferation von Fibroblasten (Murray und Robbins, 1982; Viguie et al., 1997; Ashley et al., 2007). Auch kann man eine Transformation von Typ-II-X-Fasern zu Typ-II-A-Fasern feststellen (Shiotani und Flint, 1998; Ashley et al., 2007).

Die Menge der Satellitenzellen steigt zwei bis vier Wochen nach Denervation an und erreicht nach etwa zwei Monaten ein Maximum. Danach reduziert sich die Zahl der Satellitenzellen wieder und erreicht nach etwa sieben Monaten geringere Werte als in normalen nicht-denervierten Muskeln (Ontell, 1974; McGeachie und Allbrook, 1978; Murray und Robbins, 1982; Snow, 1983; Viguie et al., 1997; Dedkov et al., 2001). In humanen Biopsien mit neurogener Atrophie ist die Menge der Satellitenzellen pro Muskelfaser im Vergleich zu normalen Biopsien erhöht (Maier und Bornemann, 1999).

Elektronenmikroskopisch kann man weitere Auswirkungen der Denervation am Skelettmuskel feststellen. Miledi und Slater beobachteten 1969 eine Disintegration der Myofilamente und eine Fragmentierung der Muskelfasern mit nachfolgender Degeneration der Fragmente (Miledi und Slater, 1969). Gauthier und Dunn konnten subsarkolemmal eine Akkumulation von Ribosomen

feststellen (Gauthier und Dunn, 1973). Lu und Mitarbeiter untersuchten die Auswirkungen von Langzeitdenervation auf die Skelettmuskulatur der Ratte. Nach Denervation über Monate fiel ein dichtes Netzwerk aus Kollagenfasern auf, das die Muskelfasern umgab. Zwei bis vier Monate nach Denervation zeigten die Satellitenzellen Zeichen von Aktivierung: Die Menge an zytoplasmatischen Organellen stieg an und die zytoplasmatischen Ausläufer wurden länger. Im Verlauf lösten sich auch Satellitenzellen von den Muskelfasern. Um atrophe Fasern herum fielen redundante Basalmembranen auf. Während manche Muskelfasern auch lange Zeit nach Denervation noch eine geordnete myofibrilläre Struktur zeigten, fiel in anderen eine sarkomere Disorganisation auf (Lu et al., 1997; de Castro Rodrigues et al., 2006; Ashley et al., 2007). Ursache für die sarkomere Disorganisation könnte ein Verlust von Titin sein, den Chen und Mitarbeiter nachweisen konnten (Chen et al., 2005). Weitere Beobachtungen nach Langzeitdenervation sind schrumpfende Mitochondrien, eine Proliferation des sarkoplasmatischen Retikulums und das Auftreten von Lipidtröpfchen, Glykogen und Autophagosomen im Zytoplasma (Lu et al., 1997). Borisov und Carlson untersuchten den Zelltod in denervierter Muskulatur. Auch sie beobachteten eine Disorganisation von Myofibrillen, die vor allem subsarkolemmal um Muskelfaserkerne herum begann und nach vier Monaten in einigen Muskelfasern das ganze Zytoplasma einnahm. Ultrastrukturell ähnelten die Beobachtungen denen bei Apoptose, jedoch waren keine Anzeichen von Autophagozytose erkennbar und auch DNA-Fragmente konnten nur in geringer Menge nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass sich die Zellkern- und Zytoplasmaveränderungen durch Denervation von der Apoptose unterscheiden (Borisov und Carlson, 2000b). Adhihetty und Mitarbeiter beobachteten einen Abfall der Mitochondrienmenge und eine verstärkte mitochondrial-vermittelte Apoptose (Adhihetty et al., 2007).

Tews und Mitarbeiter untersuchten den zeitlichen Verlauf der morphologischen Veränderungen nach Denervation an der mimischen Muskulatur der Ratte und konnten eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Fibrose und der Dauer der Denervation feststellen (Tews et al., 1994). Voytik und Mitarbeiter konnten 24 Stunden nach Denervation an der Ratte erste Veränderungen an den

Zellkernen der Muskelfasern in Form eines granulären weniger verdichteten Chromatinmusters feststellen. Von einer signifikanten Reduktion der Muskelfasergröße berichten sie zwei bis sieben Tage nach Denervation. Nach einer Woche konnten sie einen Anstieg des Verhältnisses von Kernen zum Zytoplasma verzeichnen, vier Wochen nach Denervation waren fortgeschrittene Stadien der zellulären Degradation erkennbar (Voytik et al., 1993).

Vergleicht man die Fähigkeit zur Regeneration in innerviertem und denerviertem Muskel, so zeigt sich, dass denervierte Muskulatur zwar neue Muskelfasern bilden kann, sich diese jedoch nicht zu morphologisch normaler Muskulatur entwickeln können (Mussini et al., 1987; Sesodia und Cullen, 1991; Schmalbruch und Lewis, 1994; Dedkov et al., 2001; Borisov et al., 2005). Stattdessen finden sich Verbände von unterentwickelten verzweigten Myotuben, die von einer gemeinsamen Basalmembran umgeben sind (Borisov et al., 2005). Solche Regenerationsvorgänge finden sich nach Langzeitdenervation bei der Ratte (Schmalbruch et al., 1991), nicht jedoch beim Kaninchen (Ashley et al., 2007). Beim Menschen können Regenerationsvorgänge im Rahmen einer Begleitmyopathie vorkommen.

Der Verlust der Innervation als Ursache für all diese morphologischen Veränderungen wirft die Frage auf, ob elektrische Stimulation von denerviertem Muskel die Entstehung von Atrophie verhindern kann. Dieser Frage widmeten sich verschiedene Arbeitsgruppen, indem sie über längere Zeit denervierten Muskel chronisch elektrisch stimulierten. Dabei konnten sie beobachten, dass elektrische Stimulation zu einem Erhalt des Sarkomermusters nach Denervation führt, sekundärer Degeneration und Nekrose vermutlich vorbeugt und zu einem geringeren Spannungs- und Kraftverlust führt (Al-Amood et al., 1991; Schmalbruch et al., 1991; Salmons et al., 2005). Russo und Mitarbeiter konnten beobachten, dass durch elektrische Stimulation von denerviertem Muskel die Expression von MyoD und Atrogin-1, einem Gen, das für eine skelettmuskelspezifische Ubiquitin-Protein-Ligase codiert und bei Atrophie aufreguliert wird, reduziert wird (Russo et al., 2007).

Die Geschwindigkeit der Atrophie unterscheidet sich in alten und jungen Ratten. Carlson und Mitarbeiter haben herausgefunden, dass die Atrophie nach Denervation in alten Ratten langsamer vor sich geht. Dies betrifft vor allem die Typ-II-Fasern (Carlson et al., 2002).

1.3.2 Veränderung der Genexpression durch Denervation

Grundlage vieler Veränderungen durch Denervation ist eine veränderte Genexpression. Nach Denervation an der Ratte und an der Maus konnte festgestellt werden, dass Denervation zu einer Auf- und Herunterregulierung von bestimmten Genen führt. Dabei werden Gene, die in der Embryonalentwicklung stark exprimiert werden eher aufreguliert, während Gene, die in der Embryonalentwicklung kaum exprimiert werden, eher herunterreguliert werden (Tang et al., 2000). Bei den aufregulierten Genen handelt es sich um Gene, welche eine Rolle beim Chromatin-Remodelling spielen, Transkriptionsfaktoren codieren, Muskelmembraneigenschaften regulieren, der Kopplung von Erregung und Kontraktion dienen oder zur neuromuskulären Interaktion und bei Rezeptorsignalen benötigt werden (Magnusson et al., 2005). Dabei unterscheidet sich die Genexpression nach kurzzeitiger Denervation von der Genexpression nach langfristiger Denervation (Batt et al., 2006).

1.3.3 Immunhistochemische Denervationsmarker

Der Aufregulierung von Genen nach Denervation folgt die Expression von Proteinen an der Zelloberfläche, im Zytoplasma, im Zellkern oder im Extrazellulärraum. Einige dieser Proteine können durch immunhistochemische Färbung nachgewiesen werden und so einen Hinweis auf das Vorliegen von Denervation liefern. Es gilt jedoch zu beachten, dass diese Marker nicht spezifisch für Denervation sind, sondern auch Regeneration anzeigen können (Tews und Goebel, 2005).

1.3.3.1 Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)

1.3.3.1.1 Struktur, Vorkommen und Funktion von NCAM

Das Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) ist ein Glykoprotein (Hoffman et al. 1982; Cunningham et al., 1983), das auf der Oberfläche von Neuronen (Abbildung 4), Gliazellen, neuroendokrinem Gewebe, bestimmten Tumoren und Skelettmuskulatur exprimiert wird (Edelman, 1984; Noble, 1985; Mirsky et al., 1986; Jin et al., 1991). Es dient über homophile Bindungsmechanismen der Zell-Zell-Adhäsion (Rutishauser et al., 1982; Edelman, 1984 und 1986, Ranheim et al., 1996) und spielt eine Rolle in der Signaltransduktion zwischen Zellen, beim Wachstum von Axonen und bei der synaptischen Plastizität, besonders in der Embryonalentwicklung (Edelman, 1984; Silver und Rutishauser, 1984; Thanos et al., 1984; Edelman, 1986; Olsen et al., 1993). NCAM wurde 1976 erstmals von Rutishauser und Mitarbeitern im Gehirn und in der Retina des Huhnes identifiziert (Rutishauser et al., 1976). 1982 konnten Grumet und Mitarbeitern NCAM in der embryonalen Skelettmuskulatur des Huhnes nachweisen (Grumet et al., 1982). NCAM wird durch nur ein Gen, beim Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 11, codiert (Nguyen et al., 1986), durch alternatives Spleißen entstehen jedoch viele unterschiedliche mRNAs, welche in eine Vielzahl von NCAM-Isoformen übersetzt werden (Edelman, 1984 und 1986; Murray et al., 1986; Cunningham et al., 1987; Owens et al., 1987). Die drei wichtigsten Isoformen im menschlichen Gehirn unterscheiden sich in ihrer Molekülmasse: NCAM-120kDa, NCAM-140kDa und NCAM-180kDa (Cunningham et al., 1987; Jin, 1991). NCAM-180kDa und NCAM 140kDa sind Transmembranproteine, während NCAM-120kDa GPI-verankert ist (Gennarini et al., 1984a; Barton et al., 1988; Atkins et al., 2004). Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich unter anderem in der Länge ihres zytoplasmatischen Anteils (Gennarini et al., 1984b). Im Skelettmuskel kommt NCAM mit dem Molekulargewicht 125kDa (Myotuben), 120kDa, 140kDa (Myoblasten), 145kDa (Myoblasten) und 155kDa (Myotuben) vor (Covault et al., 1986; Dickson et al., 1987; Moore et al., 1987; Figarella-Branger et al., 1992;

Fredette et al., 1993; Yoshimi et al., 1993). Die Extrazellulärdomänen der verschiedenen NCAM-Isoformen enthalten fünf Immunglobulin-artige Domänen, welche eine Rolle bei der homophilen Bindung der NCAMs spielen, und zwei Fibronectin-III-Domänen, welche für die Signalweiterleitung beim axonalen Wachstum benötigt werden (Edelman 1986, Cunningham et al., 1987; Ranheim et al., 1996; Atkins et al., 2004) (Abbildung 5). Manche NCAM-Isoformen enthalten Minor-Exons. So findet sich beispielsweise im humanen Skelettmuskel in NCAM-120kDa eine muskelspezifische Domäne (MSD1) (Dickson et al., 1987; Barton et al., 1988; Yoshimi et al., 1993). Weitere NCAM-Varianten entstehen durch posttranslationale Modifizierung durch Polysialinsäure an der fünften Immunglobulin-Domäne, wodurch die Adhäsion der Moleküle vermindert und die Zellmigration und Invasion verstärkt wird (Hoffmann et al., 1982; Cunninham et al., 1983; Finne et al., 1983; Edelman 1984; Rutishauser et al., 1988; Nakayama et al., 1995) (Abbildung 5). NCAM-140kDa ist identisch mit dem Oberflächenmolekül CD 56/Leu19, welches auf Natürlichen Killerzellen, aktivierten T-Zellen und einigen Tumoren exprimiert wird (Lanier et al., 1989; Illa et al., 1992).

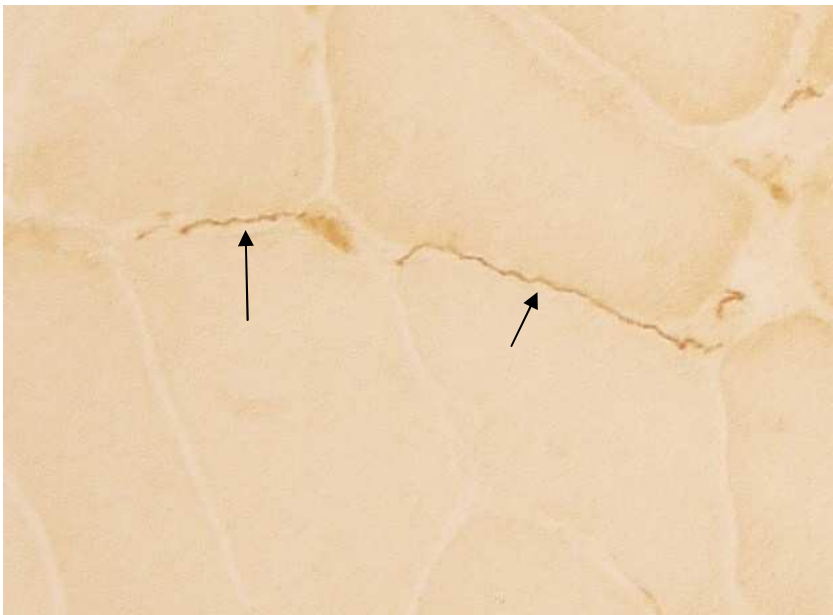


Abbildung 4:
Färbung mit Anti-
NCAM. Das Bild
zeigt mit Anti-
NCAM
angefärbte
Nervenfasern
(Pfeile).

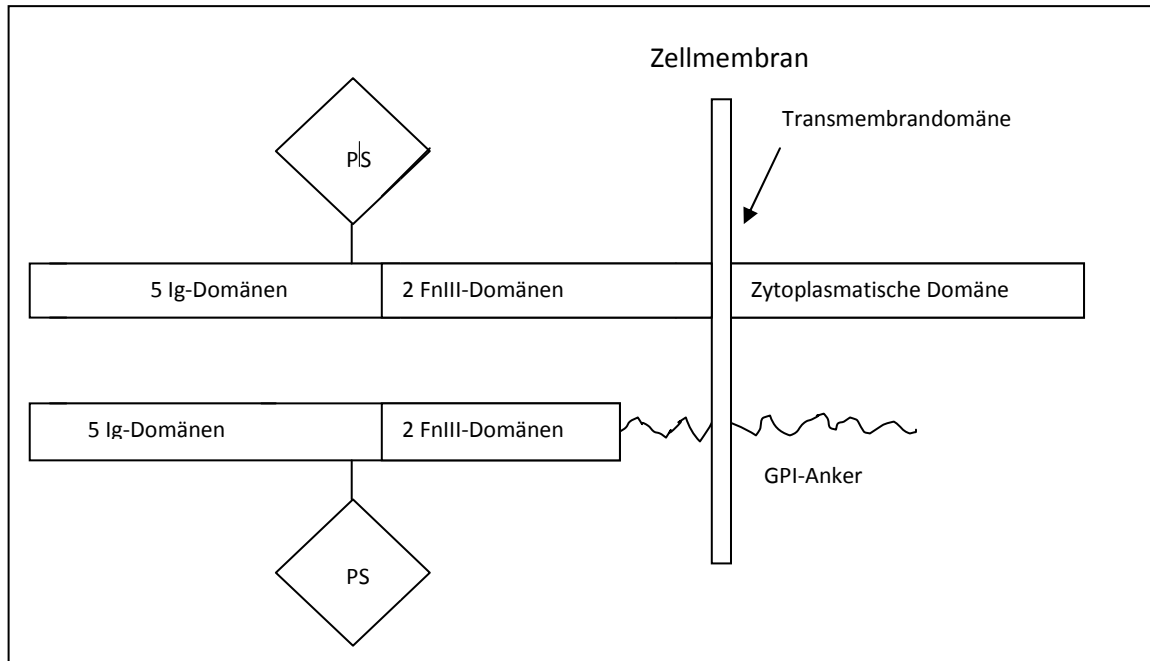


Abbildung 5: Struktur von NCAM: NCAM besteht aus fünf aminoterminalen Ig-Domänen und zwei Fibronectin-III(FnIII)-Domänen. An die fünfte Ig-Domäne können Polysialinsäuren (PS) gebunden sein. Die Isoformen, bei denen es sich um Transmembranproteine handelt, haben zusätzlich eine Transmembrandomäne und eine zyttoplasmatische Domäne. Die GPI (Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol)-verankerten Isoformen sind über einen GPI-Anker verankert.

1.3.3.1.2 Expression von NCAM nach Denervation

In der Skelettmuskulatur wird NCAM während der Entwicklung exprimiert. Diese Expression folgt einem komplexen Muster. NCAM spielt hier unter anderem eine Rolle in der Synaptogenese und in der Formierung von Nervenfaserbündeln (Rutishauser et al., 1983; Moore und Walsh, 1985; Covault und Sanes, 1986; Covault et al., 1986; Tosney et al., 1986; Frederette et al., 1993).

Im gesunden adulten Muskel kommt NCAM normalerweise nur auf der Oberfläche von Satellitenzellen und an synaptischen Endplatten vor (Moore und

Walsh, 1985; Rieger et al., 1985; Covault und Sanes, 1985; Covault und Sanes, 1986a; Cashman et al., 1987).

Denervation führt jedoch zur Reexpression von NCAM im adulten Muskel. Covault und Sanes beobachteten 1985 durch Markierung mit Anti-NCAM im Zwerchfell von Ratten das Wiederauftreten von NCAM zwei Tage nach Denervation mit einem Maximum der Färbeintensität vier bis acht Tage später. Auch im M. soleus, im M. extensor digitorum longus und in der Interkostalmuskulatur der Ratte sowie im M. soleus der Maus und im M. pectoralis des Huhns konnten sie NCAM sowohl an der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma nachweisen. Auch nach Paralyse des M. soleus und des M. extensor digitorum longus der Ratte mittels Tetrodotoxin konnten sie nach sechs bis acht Tagen eine Akkumulation von NCAM feststellen. Nach Reinnervation konnte ein rascher Rückgang der Expression von NCAM beobachtet werden (Covault und Sanes, 1985).

1986 wiesen Covault und Mitarbeiter einen Anstieg der NCAM-mRNA nach Denervation in der Ratte mit einem Maximum ca. vier Tage nach Denervation nach (Covault et al., 1986).

In weiteren Experimenten konnte ein Anstieg von NCAM nach Denervation und ein Rückgang nach Reinnervation in der Skelettmuskulatur von Maus, Huhn und Kaninchen und in der mimischen Muskulatur der Ratte nachgewiesen werden (Rieger et al., 1985; Covault et al., 1986b; Daniloff et al., 1986; Moore und Walsh, 1986; Müller-Felber, 1993).

Cashman und Mitarbeiter untersuchten 1987 die Expression von NCAM in humanen Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie. In allen 16 untersuchten Biopsien ließen sich Muskelfasern mit Anti-NCAM markieren, in normalen Biopsien lagen keine NCAM-positiven Fasern vor (Cashman et al., 1987).

In weiteren Experimenten konnten NCAM-positive Fasern in Biopsien mit neurogener Atrophie nachgewiesen werden (Walsh et al., 1987; Figarella-Branger et al., 1990; Illa et al., 1992; Winter und Bornemann, 1999), so auch

auch in Biopsien von Patienten mit spinaler Muskelatrophie vom Typ I (Werdnig-Hoffmann) und Typ III (Kugelberg-Welander) (Walsh et al., 1987).

Auch regenerierende Fasern exprimieren NCAM. Moore und Walsh konnten dies 1985 in regenerierenden Fasern in humanen Biopsien mit Polymyositis und Muskeldystrophie vom Typ Duchenne nachweisen. In degenerierenden und nekrotischen Fasern war kein NCAM nachweisbar (Moore und Walsh, 1985; Walsh und Moore, 1985). Auch bei Cashman und Mitarbeitern und Figarella-Branger und Mitarbeitern zeigte sich die Expression von NCAM in Biopsien mit regenerierenden Fasern (Cashman et al., 1987; Figarella-Branger et al., 1990).

1.3.3.2 Neonatale Isoform des Myosin Heavy Chain-Moleküls (MHCn)

1.3.3.2.1 Struktur, Vorkommen und Funktion von MHCn

Das im Skelettmuskel vorkommende Myosin ist ein Strukturprotein, das durch eine Multigenfamilie codiert wird (Nguyen et al., 1982; Robbins et al., 1982; Wydro et al., 1983). Es besteht aus zwei schweren und vier leichten Ketten (Abbildung 6). In schnellem und langsamem Muskel kommen verschiedene Myosinformen vor (Arndt und Pepe, 1975; Hoh et al., 1976; D'Albis et al., 1979; Matsuda et al., 1982; Matsuda et al., 1983). In normaler humaner adulter Skelettmuskulatur kommen in Typ-II-Fasern drei Isomyosine vor und in Typ-I-Fasern zwei verschiedene Isomyosine (Fitzsimons und Hoh, 1981b). Auch in den verschiedenen Entwicklungsstadien des Skelettmuskels treten verschiedene Isoformen von Myosin auf (Sréter et al., 1975; Roy et al., 1979; Rushbrook und Stracher, 1979; Bandman et al., 1981). Die schwere Myosinkette (MHC) ist bei der Maus auf Chromosom 11, beim Menschen auf Chromosom 7 codiert (Leinwand et al., 1983). Man unterscheidet bei den schweren Ketten embryonales MHC, MHCn, welches teilweise auch als perinatales oder fetales MHC bezeichnet wird, und adultes MHC (Fitzsimons und Hoh, 1981a; Biral et al., 1984). Zur Beginn der Myogenese wird embryonales MHC exprimiert. MHCn tritt erst perinatal auf und wird postnatal je nach Spezies nach und nach durch adultes MHC ersetzt (Whalen et al., 1981;

Bandman et al., 1982; Sartore et al., 1982; Lowey et al., 1983; Gambke et al., 1983; Gambke und Rubinstein, 1984; Bandman und Bennett, 1988). In regenerierenden Muskelfasern werden MHCn und embryonales MHC reexprimiert (Sartore et al., 1982; Cerny und Bandman, 1987; D'Albis et al., 1988; D'Albis et al., 1989; Ecob-Prince et al., 1989; Sawchak et al., 1989; Whalen et al., 1990).

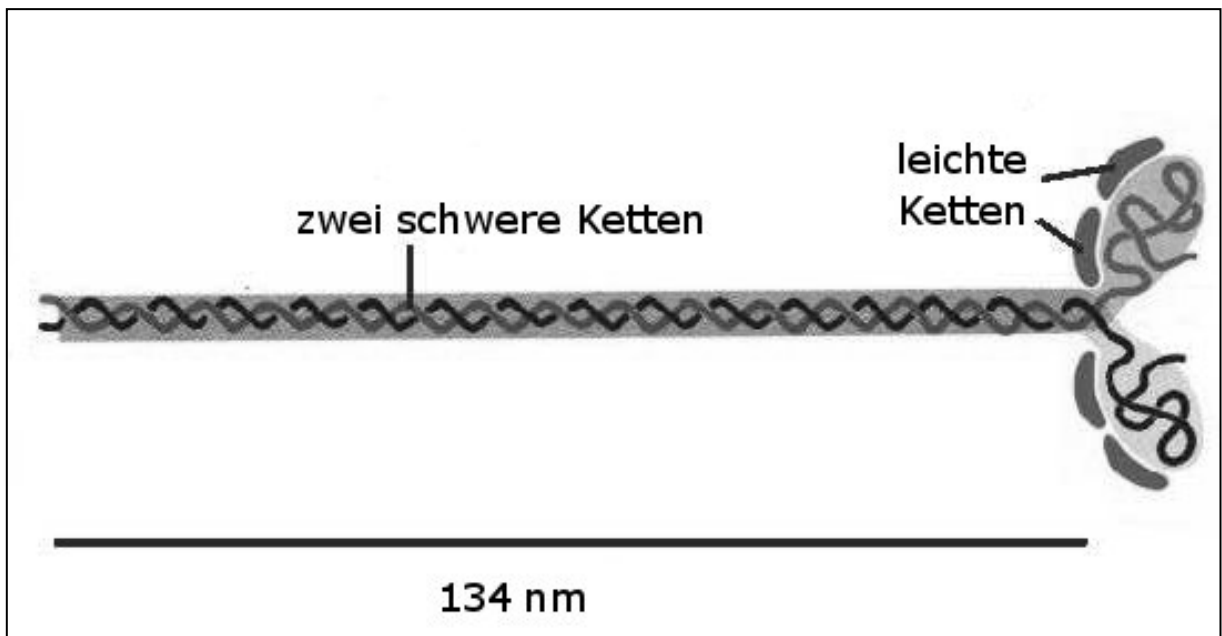


Abbildung 6: Schematische Darstellung von Myosin: Das Myosinmolekül besteht aus vier Myosin Light Chain und zwei Myosin Heavy Chain. Modifiziert nach Frings, 2003.

1.3.3.2.2 Expression von MHCn nach Denervation

Seit den 80er Jahren wurde in zahlreichen Experimenten die Auswirkung von Denervation auf die MHC-Expression untersucht.

Fitzsimons und Hoh untersuchten die MHCn-Menge in Biopsien mit Muskeldystrophie vom Typ Duchenne und in Biopsien mit infantiler spinaler Muskelatrophie elektrophoretisch. Dabei stellten sie einen Anstieg der MHCn-Menge bei Muskeldystrophie fest, was sie auf Regeneration zurückführten. Aus dem Anstieg der MHCn-Menge bei infantiler spinaler Muskelatrophie schlossen

sie, dass Innervation für den Rückgang von MHCn nötig sei (Fitzsimons und Hoh, 1981).

Butler-Browne und Mitarbeiter denervierten junge Ratten eine Woche nach der Geburt und untersuchten daraufhin den Verlauf der MHC-Expression. Sie konnten zeigen, dass die Ratten trotz Denervation zwei Wochen später adultes schnell-kontrahierendes („fast-twitch“) MHC aufwiesen, d.h. für die Expression von adultem schnell-kontrahierendem MHC ist keine Innervation nötig. Die Expression von MHCn ging in den denervierten Muskeln langsamer zurück als normal. Fünf Wochen nach Geburt wiesen jedoch auch in den denervierten Muskeln nur noch die kleinen Fasern MHCn auf (Butler-Browne et al., 1982). Gambke und Mitarbeiter kamen zu einem ähnlichen Ergebnis (Gambke et al., 1983).

Matsuda und Mitarbeiter untersuchten den MHC-Gehalt von neonatal denervierter Skelettmuskulatur an Hühnern. Es zeigte sich, dass neonatal denervierte Muskeln ebenso wie innervierte Muskeln nach einiger Zeit adultes MHC exprimieren (Matsuda et al., 1984).

Obinata und Mitarbeiter konnten durch Elektrophorese nachweisen, dass Denervation von reifem Skelettmuskel des Huhnes zur Reexpression von MHCn führt (Obinata et al., 1984).

Cerny und Bandman denervierten den M. pectoralis am adulten Huhn. Ab dem vierten Tag nach Denervation lies sich immunhistochemisch MHCn nachweisen, nach sechs Wochen waren die meisten Fasern MHCn-positiv, auch viele morphologisch ansonsten unauffällige Fasern. Trotz der deutlichen MHCn-Expression dominierte nach Quantifizierung durch einen ELISA noch das adulte MHC (Cerny und Bandman, 1987).

Schiaffino und Mitarbeiter konnten die Reexpression von MHCn nach Denervation an der Ratte immunhistochemisch zeigen. MHCn-positiv Fasern traten hier drei Tage nach Denervation zum ersten Mal auf, nach sieben und 14 Tagen waren in den meisten untersuchten Muskeln MHCn-positiv Fasern zu finden. Dabei fiel auf, dass nur Mukelfasern vom Typ IIA MHCn nach

Denervation exprimierten. Auch nach Paralyse durch Tetrodotoxin kam es zur Reexpression von MHCn (Schiaffino et al., 1988).

Janmot und d'Albis konnten den Anstieg von MHCn nach Denervation durch Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) an der Ratte und am Kaninchen bestätigen (Janmot und d'Albis, 1994).

Russell und Mitarbeiter denervierten Ratten zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Entwicklung und untersuchten die MHCn-Menge immunhistochemisch und mit S1-Nuklease-Mapping. Bei Denervation nach Geburt kam es in einigen Fasern zu einem Abfall der MHCn-Menge und einer Expression von MHC vom Typ IIB und IIX. In anderen Fasern, die vor allem dem Typ IIA angehörten, blieb MHCn bei Denervation nach Geburt erhalten. Bei Denervation der Muskulatur junger adulter Ratten kam es in Typ-IIA-Fasern zu einer Reexpression von MHCn. Nach Reinnervation ging die MHCn-Menge zurück (Russell et al., 1993).

1.3.3.3 Tenascin

1.3.3.3.1 Struktur, Vorkommen und Funktion von Tenascin

Tenascin ist ein Glykoprotein der Extrazellulärmatrix, welches nur bei Vertebraten vorkommt, bei Drosophila und beim Blutegel wurden nur Tenascin-verwandte Proteine gefunden (Baumgartner und Chiquet-Ehrismann, 1993; Masuda-Nakagawa und Nicholls, 1991; Erickson, 1993). Die Primärstruktur des Moleküls besteht aus amino-terminalen Heptad-Repeats, Epidermal Growth Factor (EGF)-Repeats und Fibronectin-III-Repeats und einer carboxyterminalen fibrinogenartigen globulären Domäne (Erickson, 1993; Jones und Jones, 2000; Chiquet-Ehrismann und Chiquet, 2003). Die einzelnen Polypeptide sind als Hexabrachion angeordnet (Jones und Jones, 2000).

Es gibt vier Formen von Tenascin: Tenascin-C, Tenascin-R, Tenascin-X und Tenascin-W. Die Buchstaben stehen dabei für Cytotactin, Restrictin und Gen X, Namen, unter denen die verschiedenen Tenascin-Formen parallel zu ihrer

Entdeckung als Tenascin gefunden wurden. Erst später wurde festgestellt, dass diese Moleküle mit Tenascin identisch sind.

Tenascin-C wird in der Embryonalentwicklung während der Morphogenese des Nerven-, Skelett- und Gefäßsystems exprimiert. Im adulten Organismus ist es in größerer Menge nur noch in Sehnengewebe, in Gewebe, in dem Umbauprozesse, wie Wundheilung, Neovaskularisierung und Entzündung stattfinden und in Tumorgewebe vorhanden (Koukoulis et al., 1991; Whitby and Ferguson, 1991; Whitby et al., 1991; Erickson, 1993; Hsia und Schwarzbauer, 2005).

Tenascin-R kommt vor allem im zentralen Nervensystem vor (Pesheva et al., 2001). Im peripheren Nervensystem wurde es nur in Schwann-Zellen nachgewiesen (Probstmeier et al., 2001). Es wird in der Entwicklung des zentralen Nervensystems etwas später als Tenascin-C exprimiert (Hsia und Schwarzbauer, 2005). Möglicherweise spielt es eine Rolle beim neuronalen Wachstum im adulten Organismus (Becker et al., 2004; Saghatelyan et al. 2004) und in der Neuroprotektion (Angelov et al., 1998).

Tenascin-X wird vor allem während der Entwicklung exprimiert. Im adulten Organismus kommt es nur in Geweben des Skelettmuskels, des Herzens und der Haut vor. Eine Mutation des Tenascin-X-Gens führt zu einer Form des Ehlers-Danlos-Syndroms (Mao und Bristow, 2001; Zweers et al., 2004; Bristow et al., 2005).

Tenascin-W wird in der Entwicklung von Skelett- und Nervengewebe überlappend mit Tenascin-C exprimiert. Große Mengen an Tenascin-W konnten vor allem im Zebrafisch nachgewiesen werden (Hsia und Schwarzbauer, 2005).

Obwohl Tenascin in sehr vielen Geweben vorkommt, scheint es nicht überlebenswichtig zu sein. Tenascin-C- und Tenascin-R-Knock-out-Mäuse zeigen keine Auffälligkeiten im Phänotyp (Saga et al, 1992; Forsberg et al., 1996; Weber et al., 1999). Bei genaueren Untersuchungen konnten jedoch auffälliges Verhalten, neurochemische Veränderungen, Abnormitäten im peripheren Nervensystem, Veränderungen an Glianarben, fehlende

Regeneration nach Glomerulonephritis, stärkere Reaktion bei Hapten-induzierter Dermatitis, veränderte Wundheilung, veränderte Struktur bei Tumoren und reduzierte Hämatopoese in Tenascin-C-Knock-out-Mäusen nachgewiesen werden (Mackie und Tucker, 1999; Freitag et al., 2003; Montag-Sallaz und Montag, 2003).

1.3.3.3.2 Expression von Tenascin nach Denervation

Einige Arbeitsgruppen haben in den 90er Jahren den Einfluss von Denervation auf die Expression von Tenascin untersucht.

Irintchev und Mitarbeiter konnten im M. soleus der Maus zeigen, dass Denervation zu einem Anstieg von Tenascin an den denervierten Endplatten und in intramuskulären Nervensträngen führt. Verletzung durch starke körperliche Belastung oder Erfrierung führt zu einem Anstieg von Tenascin nach zehn Stunden mit einem Maximum nach zwei bis drei Tagen. Zwei Wochen nach der Verletzung ist kein Tenascin mehr detektierbar. Nach Paralyse durch Applikation von Botulinumtoxin konnten sie keinen Anstieg von Tenascin nachweisen (Irintchev et al., 1993).

Tews und Mitarbeiter untersuchten die Expression von Tenascin nach Denervation an der mimischen Muskulatur der Ratte. In innerviertem Muskel war hier kein Tenascin nachweisbar. Zwei Wochen nach Denervation wurde Tenascin stark exprimiert, nach sechs Wochen ging die Expression von Tenascin vollständig zurück. Nach Reinnervation ging die Expression von Tenascin nach sieben Wochen völlig zurück (Tews et al., 1997).

Schoer und Goebel untersuchten die Expression von Tenascin in humanen Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie. Während in gesunden Muskeln keine Immunreaktivität erkennbar war, zeigten 17 von 18 untersuchten Biopsien mit neurogener Atrophie Immunreaktivität für Tenascin. Tenascin fand sich dabei nicht nur an atrophischen Fasern, sondern auch im Bereich von Fasern von normaler Größe. Beim Vergleich von neurogener Atrophie bei Kindern und Erwachsenen fiel auf, dass in kindlichen Biopsien mit neurogener Atrophie in

nur zwei von zwölf untersuchten Biopsien Tenascin eindeutig positiv war (Schoser und Goebel, 1996).

Hurme und Kalimo konnten zeigen, dass Regeneration von Muskelfasern zu einer Expression von Tenascin führt. Im gesunden Muskel war Tenascin hingegen auf die Übergänge zwischen Sehnen und Muskeln beschränkt (Hurme und Kalimo, 1992).

Gatchalian und Mitarbeiter untersuchten die Frage, welche Zellen das nach Denervation im Bereich der Synapsen exprimierte Tenascin synthetisieren und konnten feststellen, dass dieses von Fibroblasten stammt und vermutlich Teil einer allgemeinen Zellaktivierung nach Denervation ist (Gatchalian et al., 1989).

1.3.3.4 Myogene regulatorische Faktoren (MRFs)

1.3.3.4.1 Struktur, Vorkommen und Funktion der MRFs

Die myogenen regulatorischen Faktoren (MRFs) sind skelettmuskelspezifische Transkriptionsfaktoren (Tapscott et al., 1988; Weintraub et al., 1991). Zu ihnen gehören MyoD, Myogenin, Myf5 und MRF4 (Buckingham, 1992). Sie bestehen aus einer basischen Region und einem Helix-Loop-Helix-Motiv aus 70 Aminosäuren (Edmondson und Olson, 1993; Olson, 1993; Rescan, 2001). Mit der basischen Region können die MRFs an eine bestimmte DNA-Sequenz in den regulatorischen Regionen von verschiedenen muskelspezifischen Genen, der sogenannten E-Box binden (Lassar et al., 1989; Buckingham, 1992; Mohun, 1992; Olson, 1992). Diese Bindung vermittelt unter anderem die Expression des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (Baldwin und Burden, 1989; Wang et al., 1990; Bessereau et al., 1994; Tang et al., 1994). Die Bindung der MRFs an die DNA kann durch Heterodimerisierung mittels Bindung eines Helix-Loop-Helix-Proteins (z.B. MEF-2, NF-1, COMP1) an das Helix-Loop-Helix-Motiv verstärkt werden (Buckingham, 1992; Funk und Wright, 1992; Mohun, 1992; Olson, 1992; Olson, 1993; Rescan, 2001).

Die MRFs spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung von Skelettmuskelfasern in der Embryonalentwicklung und in Regenerationsphasen (Weintraub et al., 1991; Braun, et al., 1992; Grounds et al., 1992; Li und Olson, 1992; Olson, 1992; Olson, 1993; Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993). MyoD und Myogenin werden in der Embryonalentwicklung in Somiten und Extremitätenknospen exprimiert (Sassoon et al., 1989; Wright et al., 1989). Nach der Embryonalentwicklung sinkt die Expressionsrate von MyoD, Myogenin und Myf-5 im Muskel, nur noch MRF4 wird exprimiert, welches auch noch in innervierter adulter Skelettmuskulatur als mRNA nachweisbar ist (Rhodes und Konieczny, 1989; Duclert et al., 1991; Hinterberger et al., 1991; Buonanno et al., 1992; Dias et al., 1992).

MyoD und Myogenin kommen auch in aktivierten Satellitenzellen vor. MyoD schon zu Beginn der Aktivierung, Myogenin erst bei der terminalen Differenzierung der Satellitenzellen (Yablonka-Reuveni und Rivera, 1994). Deutlich wird die wichtige Funktion der MRFs in der Myogenese außerdem dadurch, dass sie bei ektopischer Expression in der Lage sind verschiedene Zelltypen in die myogene Zelllinie zu überführen (Davis et. al., 1987; Tapscott et al., 1988; Edmondson und Olson, 1989). Diagnostisch können Antikörper gegen Myogenin und MyoD in der immunhistologischen Diagnose des Rhabdomyosarkoms genutzt werden, da diese Tumoren Myogenin und MyoD exprimieren (Dias et al., 1990; Dias et al. 1992; Hosoi et al., 1992; Folpe, 2002; Sevire und Malone, 2003).

1.3.3.4.2 Expression von MyoD und Myogenin nach Denervation

Zu Beginn der 90er Jahre konnten verschiedene Arbeitsgruppen einen Anstieg der mRNAs von aller MRFs in Ratte und Maus nach Denervation nachweisen. Dabei stieg die mRNA von Myogenin schon acht Stunden nach Denervation an und erreichte nach zwei Tagen ihr Maximum. Die mRNA von MyoD stieg 16 Stunden nach Denervation an und erreichte sieben Tage später die 15fache Menge (Eftimie et al., 1991; Witzemann und Sakmann, 1991a; Voytik et al., 1993; Buonanno et al., 1993; Kostrominova et al., 2000). Hierbei zeigen sich

Parallelen zum Anstieg der mRNA-Menge der α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors (Duclert et al., 1991). Elektrische Stimulation kann die Akkumulation von MyoD- und Myogenin-Transkripten nach Denervation unterdrücken (Eftimie et al., 1991). Die Paralyse mittels Botulinumtoxin führt ebenso wie Denervation zu einem Anstieg der mRNA-Mengen von Myogenin und MyoD (Witzemann und Sakmann, 1991a).

Die Erhöhung der Transkriptmenge geht mit einer Erhöhung der Expression der Proteine einher, was sich immunhistochemisch 2,5 Tage nach Denervation nachweisen lässt (Weis, 1994; Weis et al., 2000). Nach Langzeitdenervation bleibt die mRNA-Menge von Myogenin und MRF4 bis einen Monat nach Denervation erhöht, während die mRNA-Menge von MyoD und Myf5 mindestens sieben Monate lang erhöht bleibt (Adams et al., 1995). Bei Untersuchung der Immunreaktivität von MyoD in humanen Muskelbiopsien konnten Parham und Mitarbeiter in Biopsien mit neurogener Atrophie eine deutliche Immunreaktivität von Kernen und Zytoplasma zeigen, vor allem in angulär-atrophen Fasern. In Biopsien mit Muskeldystrophie und in Biopsien mit Myositis färbten sich Kerne vor allem in Arealen, in denen Nekrose oder Regeneration vorlag (Parham et al., 1994). Olivé und Mitarbeiter konnten bei neurogener Atrophie keine Immunreaktivität für MRFs feststellen, jedoch in Satellitenzellen und regenerierenden Fasern in Biopsien mit Muskeldystrophie und in Biopsien mit Polymyositis (Olivé et al., 1997).

Hyatt und Mitarbeiter untersuchten die Wirkung von aktivitätsabhängigen und aktivitätsunabhängigen neuronalen Einflüssen auf die Expression von MyoD und Myogenin, indem sie die mRNA-Menge von MyoD und Myogenin in Muskeln nach Denervation und nach Durchtrennung des Rückenmarks verglichen. Nach Denervation und nach Durchtrennung des Rückenmarks kam es zu einem Anstieg der mRNA-Mengen von MyoD und Myogenin. In den Fällen mit durchtrenntem Rückenmark fiel die mRNA-Menge jedoch nach 14 Tagen ab, während sie in denerviertem Muskel erhöht blieb. Die Muskelmasse nahm in denervierten Muskeln stärker ab. Die mitotische Aktivität von Satellitenzellen und Bindegewebszellen war in den Muskeln mit durchtrenntem

Rückenmark geringer. Dies deutet darauf hin, dass neuronale Einflüsse unabhängig von der elektrischen Aktivität muskelspezifische Gene regulieren und einem Verlust der Muskelmasse vorbeugen (Hyatt et al., 2003).

Aktiviert Satellitenzellen exprimieren MyoD, während ruhende Satellitenzellen MyoD-negativ sind (Koishi et al., 1995). In Satellitenzellen von innerviertem Muskel findet sich viel Myf5-mRNA und wenig MyoD- und Myogenin-mRNA und -Protein. Nach Denervation findet sich in den Satellitenzellen zwar noch Myf5-mRNA, wenig Myogenin- und MRF4-mRNA, jedoch kein MyoD und MRF4-Protein mehr (Maier et al., 2002).

Regeneration führt zu einem Anstieg der MRFs (Grounds et al., 1992; Kami et al., 1995; Cooper et al., 1999; Launay et al., 2001). In MyoD-Knock-out-Mäusen ist die Regenerationsfähigkeit vermindert (Megeney et al., 1996).

1.3.4 Reinnervation

Durch Reinnervation wird wieder eine neuromuskuläre Verbindung hergestellt. Nach Durchtrennung eines peripheren Nervs kommt es zunächst zu einer Degeneration des distalen Teils des Nerven (Miledi und Slater, 1968). Nach 24 bis 36 Stunden jedoch kommt es zum Aussprossen von Axonen vom proximalen Nervenstumpf aus (Miledi und Slater, 1970). Die nach Nervendurchtrennung verbliebenen Schwann-Zellen dienen dabei als Führungsstruktur (Brushart, 1988; Brushart et al., 1998). Die Reinnervation erfolgt dabei nicht unbedingt durch den gleichen Nerv, der den Muskel vor Denervation innerviert hat. Aussprossende Axone bilden mit den Muskelfasern Synapsen, auf die sie zuerst treffen. Die Kontraktionsgeschwindigkeit des innervierenden motorischen Nervens legt dabei den Fasertyp der reinnervierten Muskelfaser fest. Dies erklärt auch das Zustandekommen von Fasertypengruppierung (Brown und Ironton, 1978; Gramsbergen et al., 2000; Ijckema-Paasen et al., 2001).

1.3.4.1 Einfluss der Reinnervation auf durch Denervation hervorgerufene morphologische Veränderungen

Reinnervation hat einen großen Einfluss auf die im obigen Kapitel beschriebenen nach Denervation auftretenden morphologischen Veränderungen. Nach Reinnervation bilden sich neue motorische Endplatten aus und die Menge der Muskelfasern steigt wieder an (Anzil und Wernig, 1989). Morphologisch ist der reinnervierte Muskel fast normal, die Anzahl der Muskelfasern weicht nicht vom normalen Muskel ab, lediglich der Durchmesser ist leicht verringert (Irintchev et al., 1990). Insgesamt wird die neurogene Atrophie durch Reinnervation zumindest teilweise rückgängig gemacht (Tews et al., 1994). Diese Wirkung der Reinnervation kann durch elektrische Stimulation sogar noch verstärkt werden (Marqueste et al., 2006).

Fu und Gordon untersuchten die Auswirkung von Langzeitdenervation auf die Fähigkeit zur Reinnervation. Sie konnten feststellen, dass nach längerer Denervation die Reinnervation durch eine geringere Anzahl an Axonen erfolgt, die motorischen Einheiten nahmen in ihrer Anzahl ab, in ihrer Größe und Kraft allerdings zu. Dies führten sie auf eine zunehmende Zerstörung der intramuskulären Nervenfaserscheide zurück. Der Muskelfaserdurchmesser in den reinnervierten Muskeln nahm mit der Dauer des Intervalls zwischen Denervation und Reinnervation ab (Fu und Gordon, 1995a, Fu und Gordon, 1995b).

1.3.4.2 Einfluss der Reinnervation auf die Expression von Denervationsmarkern

Reinnervation führt nicht nur zu einem Rückgang der morphologischen Auffälligkeiten des denervierten Muskels, sondern auch zu einem Rückgang der nach Denervation exprimierten Marker NCAM, MHCn, Tenascin, Myogenin und MyoD (Covault und Sanes, 1985; Cashman et al., 1987; Witzemann und Sakmann, 1991; Russell et al., 1993; Tews et al., 1997). Schon zwei Wochen nach Reinnervation findet sich kaum mehr NCAM im reinnervierten Muskel (Covault und Sanes, 1985). Nach zehn Wochen erreicht die NCAM-Menge den

gleichen Wert wie im normalen Muskel (Tews et al., 1997). Die mRNA-Menge von MyoD und Myogenin erreicht nach drei Wochen den Normalwert (Witzemann und Sakmann, 1991). Nicht nur Muskelfasern, die zuvor denerviert waren, exprimieren nach Reinnervation kein NCAM mehr. Auch an neugebildeten Myotuben sinkt die Menge von NCAM nach Innervation ab (Cashman et al., 1987).

1.3.4.3 Einfluss von Reinnervation auf die Genexpression

Die Effekte von Reinnervation auf die Muskulatur lassen vermuten, dass nicht nur bei Denervation eine veränderte Genexpression vorliegt, sondern dies auch bei Reinnervation der Fall ist. Für verschiedene Genes konnte dies schon festgestellt werden.

Insulin-like growth factor (IGF) unterstützt die Regeneration von Axonen von motorischen Nerven. Glazner und Ishii konnten an der Ratte feststellen, dass das IGF-II-Gen bei Reinnervation im Muskel aufreguliert wird (Glazner und Ishii, 1995). An diabetischen Ratten konnte gezeigt werden, dass die intrathekale Infusion von Insulin oder IGFII der axonalen Atrophie vorbeugt und die Abnormalitäten der Reizleitung vermindert (Brussee et al., 2004).

Caiozzo und Mitarbeiter konnten an der Ratte sowohl bei Denervation als auch bei Reinnervation eine gesteigerte Expression von Genen feststellen, die den Zellzyklus inhibieren. Sie vermuteten hierbei einen Zusammenhang zum Rückgang der Satellitenzellen einige Zeit nach Denervation und zur Verminderung der Zellkerne nach Denervation durch Apoptose (Caiozzo et al., 2004).

Zhou und Mitarbeiter untersuchten, ob Satellitenzellen zur Volumenzunahme beim Muskelfaserwachstum nach Reinnervation beitragen. Dabei fiel auf, dass sich im reinnervierten Muskel im Vergleich zum kontralateralen Kontrollmuskel 13 Gene in der Regulation unterschieden. Darunter waren Gene, die den langsamen Muskelfasertyp bestimmen, und neural-regulierte Gene. Die Reaktion der Satellitenzellen zeigte im kontralateralen Muskel keinen

Unterschied, woraus geschlossen wurde, dass diese nicht zum Muskelfaserwachstum nach Reinnervation beitragen (Zhou et al., 2006).

1.3.5 Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie

Unter neurogener Atrophie versteht man Atrophie durch Denervierung. Denervierung kann beim Menschen durch Motoneuronerkrankungen oder durch Durchtrennung einer Nervenwurzel oder eines peripheren Nerven zustande kommen. Die häufigsten zugrunde liegenden Erkrankungen sind die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und Polyneuropathien. Fasertypengruppierung, Target-Fasern, angulär-atrophe Fasern und Nuclear Clumps sind morphologische Auffälligkeiten in der Muskelbiopsie, die einen Hinweis auf das Vorliegen einer neurogenen Atrophie liefern.

Target-Fasern stellen regionale Veränderungen im Muskelfaserquerschnitt dar und finden sich meist in der Mitte von Fasern (Abbildung 7). Sie bestehen aus drei konzentrischen Ringen, die sich in ihrer enzymatischen Aktivität und in ihrer immunhistochemischen Reaktivität für Desmin, Dystrophin, α B-Crystallin, Aktin und α -Aktinin unterscheiden. Target-Fasern kommen nur in Typ-I-Fasern vor. Sie entstehen möglicherweise im Verlauf der Reinnervation und experimentell bei Tenotomie, nicht jedoch nach experimenteller Denervation (Banker und Engel, 2004).

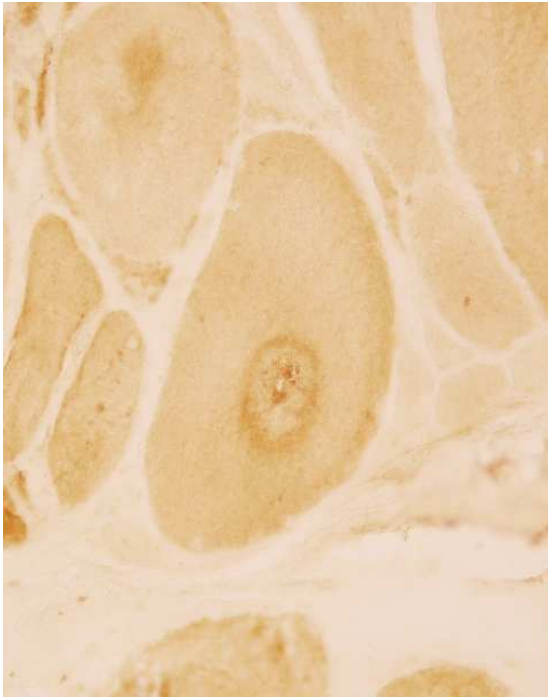


Abbildung 7: Färbung mit Anti-NCAM: In Bildmitte ist eine Target-Faser zu sehen. Die konzentrischen Ringe sind deutlich zu erkennen.

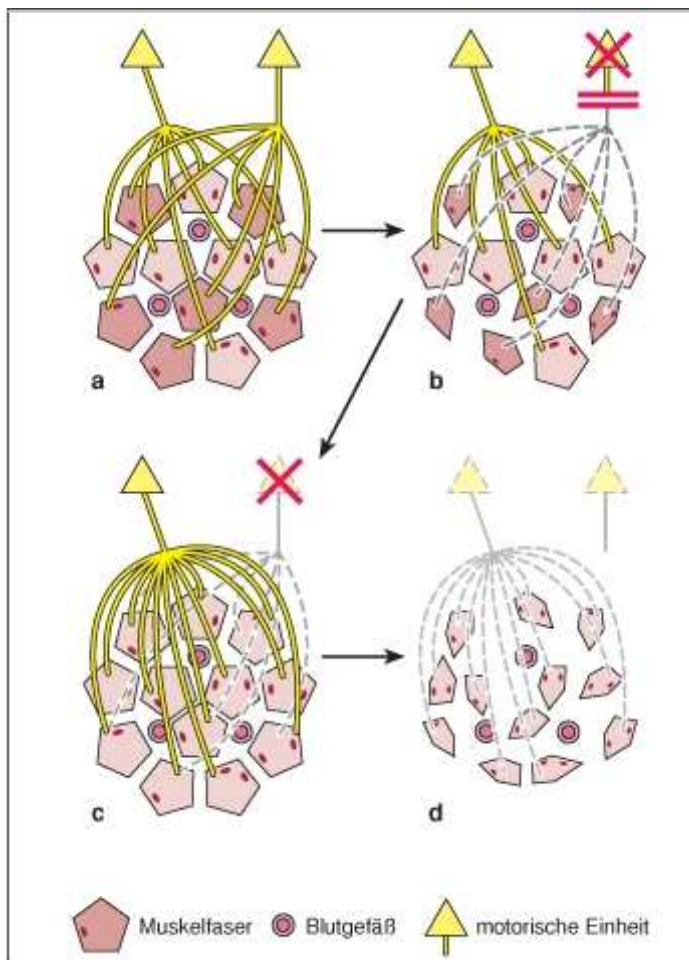


Abbildung 8: Schritte der neurogenen Atrophie schematisch.

A: Normalzustand

B: Ausfall einer motorischen Einheit

C: Zunächst kompensiert die benachbarte motorische Einheit den Ausfall (mit Fasertypengruppierung)

D: Später degeneriert das kompensierende Neuron, und man erkennt die typische Gruppenatrophie

(Böcker et al., 2004, © Elsevier GmbH)

Fasertypengruppierung entsteht durch Reinnervation. Im gesunden Muskel liegen Typ-I- und Typ-II-Fasern schachbrettartig verteilt vor. Dies kann durch ATPase-Färbung sichtbar gemacht werden. Durch Durchtrennung eines Nerven oder durch Untergang eines Motoneurons kann es zur Denervation einer oder mehrerer motorischer Einheiten kommen. Unter einer motorischen Einheit versteht man die Gesamtheit eines Axons und der von ihm innervierten Muskelfasern. Werden die denervierten Fasern nun von einem anderen Nerven reinnerviert, so nehmen sie dessen Fasertyp an. So kommt es zu einer Vergrößerung der motorischen Einheiten und dazu, dass Fasern vom gleichen Fasertyp nebeneinander liegen. Werden in Gruppen liegende Fasern eines Types erneut denerviert, so kommt es zum Vorliegen von atrophischen Fasern in Gruppen, was in Biopsien mit neurogener Atrophie auch häufig beobachtet werden kann (Jennekens et al., 1974; Manz, 1980; Banker und Engel, 2004) (Abbildung 8).

Als angulär-atrophische Fasern bezeichnet man kleine Fasern, die konkave Seiten aufweisen (Abbildung 9). Sie können einzeln vorkommen und liegen dann oft zwischen normal großen Fasern, können jedoch auch in Gruppen auftreten. Außerdem zeichnen sie sich durch eine stark positive Esterase-Reaktion aus. In der Regel sind beide Fasertypen von der Denervation betroffen (Banker und Engel, 2004).

Im Endstadium der neurogenen Atrophie können sogenannte Nuclear Clumps auftreten (Abbildung 10). Darunter versteht man pyknotische Zellhaufen, die sich um die Fasern herum anordnen. Sie entstehen durch Denervation ohne nachfolgende Reinnervation (Jerusalem, 1975; Manz, 1980).

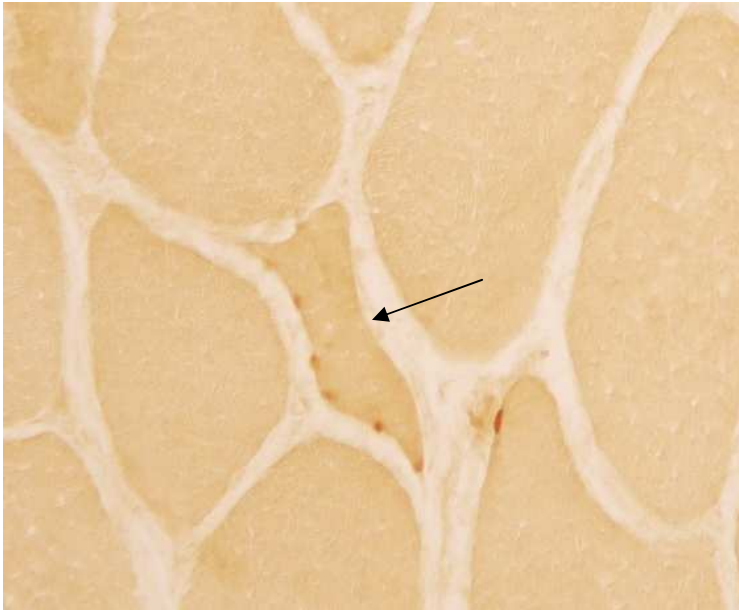


Abbildung 9: Färbung mit Anti-Myogenin (20x): In Bildmitte ist eine angulär-atrophe Faser zu sehen (Pfeil). Die Faser ist kleiner als die umgebenden normal großen Fasern und die konkaven Ränder sind deutlich zu erkennen.

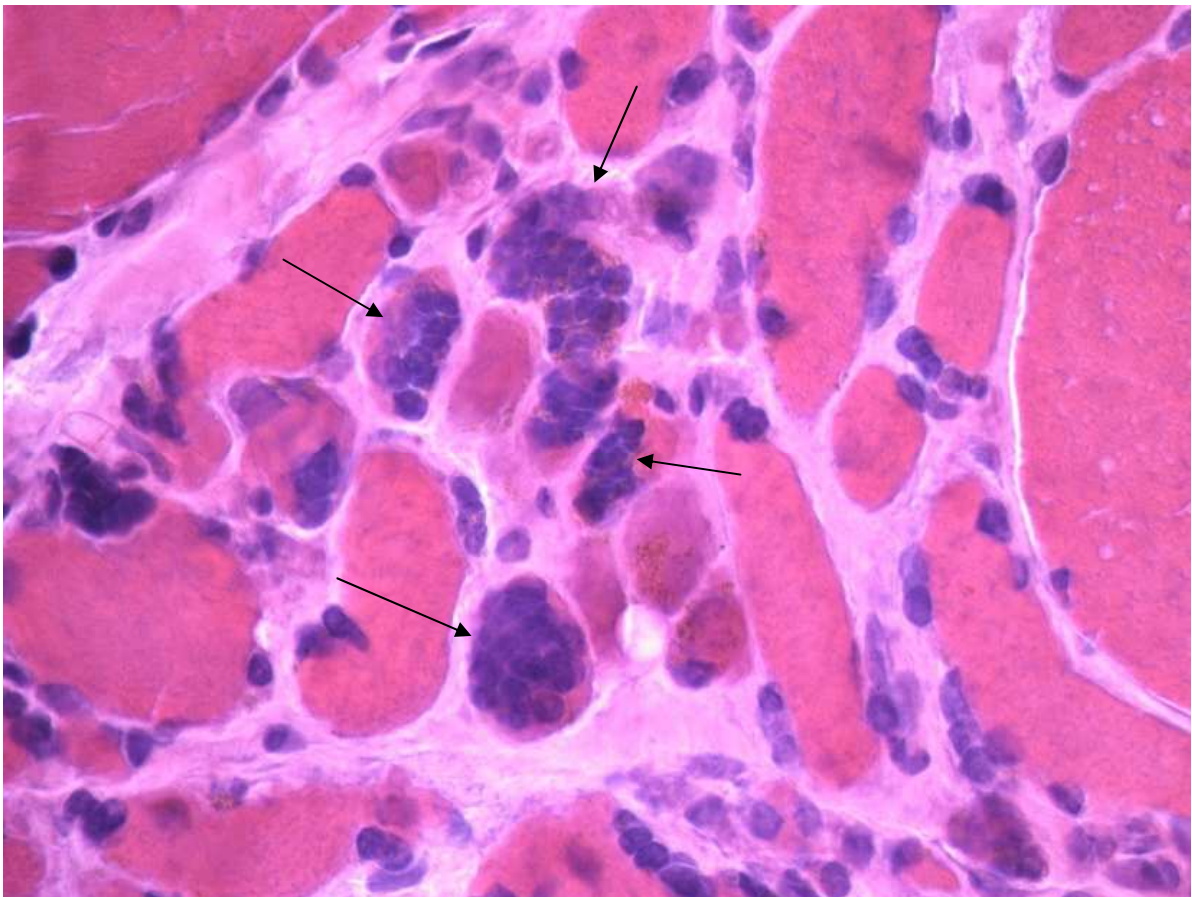


Abbildung 10: HE-Färbung: Das Bild zeigt einige der für Denervation typischen Nuclear Clumps (Pfeile).

Im Gegensatz zur experimentellen Denervation durch Durchtrennung eines Nerven im Tierexperiment muss man bei Biopsien mit neurogener Atrophie jedoch beachten, dass meist nicht alle Fasern einer Biopsie denerviert sind und man nicht sicher sagen kann, welche Fasern von Denervation betroffen sind und welche nicht, denn nicht alle denervierten Fasern werden sofort angulär-atroph. Durch kompensatorische Hypertrophie von Fasern kann es zu unterschiedlich großen Fasern kommen (Manz, 1980).

1.4 Ziel der Arbeit

Viele Arbeiten in den letzten Jahrzehnten haben sich mit den Auswirkungen von Denervation befasst. Dabei ging es in den meisten Fällen entweder um morphologische Veränderungen oder um die Expression bestimmter Marker. Nur selten wurden sowohl die morphologischen Veränderungen als auch die Expression von Denervationsmarkern im Zusammenhang untersucht und wenn, dann ging es meist um die Dynamik dieser beiden Denervationseffekte. Der direkte Zusammenhang zwischen der Morphologie einer Muskelfaser und der Expression von Denervationsmarkern wurde bisher kaum näher untersucht.

In humanen Muskelbiopsien werden die einzelnen Fasern nicht alle zu einem definierten Zeitpunkt denerviert, sondern im Krankheitsverlauf treten immer wieder Denervation, Reinnervation und erneute Denervation auf. Dies führt zu einem gleichzeitigen Vorliegen von Fasern in verschiedenen Stadien der Denervation und Reinnervation und von unterschiedlicher Fasermorphologie innerhalb einer Biopsie. In dieser Arbeit soll daher versucht werden, durch kombinierte Anwendung der Marker Tenascin, MHCn, NCAM und Myogenin, die in der Literatur als Marker für Denervation etabliert sind, die Dynamik von Denervation und Reinnervation bei neurogener Atrophie auf der Einzelbiopsieebene zu beschreiben. Dabei liegen die Antigene der verschiedenen Marker in unterschiedlichen Kompartimenten: Myogenin im Zellkern, Tenascin in der extrazellulären Matrix, MHCn im Zytoplasma und NCAM sowohl im Zytoplasma als auch auf der Zellmembran, was Unterschiede in der Expression während des Denervationsvorganges erwarten lässt.

2. Material und Methoden

2.1 Auswahl der Muskelbiopsien

2.1.1 Patienten

Für die Arbeit wurden 66 Muskelbiopsien verwendet, die zwischen 2001 und 2006 entnommen wurden und zur neuropathologischen Diagnostik an das Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen versandt wurden.

Es wurden nur Muskelbiopsien ausgewählt, bei denen aufgrund der Routinediagnostik mit den üblichen histologischen und enzymhistochemischen Färbungen (Hämatoxylin-Eosin, Van Gieson, PAS, Trichrom, Ölrot O, NADH, COX, COX-SDH, SDH, saure Phosphatase, AMPDA, ATPase, Phosphorylase) die Diagnose „neurogene Atrophie“ gestellt werden konnte (siehe Dubowitz, 1985).

Tabelle 1 zeigt Alter, Geschlecht und Klinik der biopsierten Patienten.

Biopsien mit nekrotischen, basophilen oder Vimentin-positiven Arealen als Hinweis auf Regenerationsvorgänge wurden ausgeschlossen.

Die Biopsien entstammen alle dem M. vastus medialis, M. gastrocnemius, M. biceps brachii oder M. deltoideus und wurden unter Lokalanästhesie entnommen. Nach der Entnahme wurden die Biopsien schockgefroren und bei -195°C im Stickstofftank aufbewahrt.

Das Alter der Patienten lag zwischen 14 und 82 Jahren, das durchschnittliche Alter betrug 58,5 Jahre. 46 Patienten waren männlich, 20 waren weiblich.

Tabelle 1: Übersicht über Alter, Geschlecht und Klinik der biopsierten Patienten.

	Alter	Geschlecht	Klinik
1	57	m	PNP
2	63	w	V.a. Myopathie
3	52	m	PNP
4	58	m	PNP
5	34	m	V.a. autosomal-dominante Erkrankung
6	18	m	axonale Neuropathie (N. suralis)
7	65	w	PNP
8	58	m	Motoneuronerkrankung
9	36	m	Motoneuronerkrankung
10	65	m	???
11	77	w	PNP
12	60	m	V.a. Myositis
13	55	m	Schmerzen
14	43	m	Hirnfarkt, neurogene Muskelatrophie
15	71	m	Motoneuronerkrankung
16	49	w	V.a. Myositis, EMG: Denervierung
17	53	m	V.a. Dystrophie
18	70	m	PNP
19	60	m	???

20	66	w	Schwäche seit Kindheit, geringgradige neurogene Atrophie
21	75	m	ALS
22	51	m	PNP
23	65	m	ALS
24	61	w	Motoneuronerkrankung
25	60	m	PNP
26	52	w	Motoneuronerkrankung
27	67	w	Atrophie
28	66	w	PNP
29	60	m	Vaskulitis peripheres Nervengewebe, rheumatische Systemerkrankung
30	72	m	Schmerzen
31	71	m	PNP
32	70	m	Motoneuronerkrankung
33	33	w	Tetraparese
34	69	m	PNP
35	55	m	PNP
36	56	m	IBM
37	73	m	Motoneuronerkrankung
38	55	m	ALS

39	75	w	ALS
40	66	m	PNP
41	43	m	schlafte Parese
42	72	w	ALS
43	14	m	V.a. SMA Typ 3 (Kugelberg-Welander)
44	18	w	axonale Schädigung, V.a. Charcot-Marie-Tooth
45	71	w	Tetraparese, NLG o.B.
46	61	m	PNP
47	76	m	PNP
48	63	w	V.a. SLE (systemischer Lupus), DD Vaskulitis paraneoplastisch, DD Dermatomyositis
49	59	m	V.a. McArdle
50	53	m	PNP
51	62	w	distale Parese
52	66	m	V.a. ALS oder PNP
53	72	m	Motoneuronerkrankung
54	44	w	V.a. mitochondriale Myopathie, DD metabolisch
55	25	m	ALS, DD spinocerebelläre Erkrankung
56	50	m	V.a. Myopathie
57	51	m	???
58	82	w	V.a. myotone Dystrophie DD Dermatomyositis

59	62	m	Vaskulitis N.suralis
60	67	m	PNP sensomotorisch, Myositis
61	73	w	PNP
62	59	m	ALS
63	51	m	Motoneuronerkrankung
64	74	w	EMG: Denervation, neurogen
65	60	m	axonale Polyneuropathie
66	70	m	V.a. Muskeldystrophie, NLG o.B.

2.2 Immunhistochemische Färbungen

2.2.1 Grundprinzip der immunhistochemischen Färbungen nach der ABC-Methode

Bei der immunhistochemischen Färbung nach der ABC-Methode werden an der Zelloberfläche, im Zellkern oder im Zytoplasma exprimierte Antigene mit Hilfe von spezifischen Antikörpern markiert und sichtbar gemacht. Das darzustellende Antigen wird dazu zunächst mit einem unkonjugierten Primärantikörper inkubiert. Nach Entfernung überschüssiger ungebundener Antikörper durch Waschen erfolgt die Inkubation mit dem biotinmarkierten Sekundärantikörper, welcher an den Primärantikörper bindet. Nach erneutem Waschen folgt die Inkubation mit dem AB-Komplex. Dieser setzt sich aus einem Gemisch mit Avidin und biotinyliertem Enzym (Meerrettichperoxidase) zusammen. Dieses Gemisch muss vor Gebrauch 30 min vorinkubieren, damit sich ein Avidin-Biotin-Enzymkomplex bilden kann.

Nach dem Auftragen bindet das Avidin an den biotinylierten Sekundärantikörper. Inkubiert man nun mit einer Substrat-Chromogen-Lösung,

meist mit H₂O₂ als Substrat und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen, so bildet sich durch die Peroxidaseaktivität zunächst ein Enzym-Substrat-Komplex. Danach erfolgt die Katalyse des H₂O₂ mit dem Chromogen als Elektronendonator, welches durch die Oxidation in ein gefärbtes und unlösliches Produkt umgewandelt wird. DAB bildet auf diese Weise ein braunes Endprodukt (Boenisch, 2001).

2.2.2 Primärantikörper

Anti-NCAM

Monoklonaler Mausantikörper

Immunogen: sechzehn Wochen altes menschliches fetales Hirnhomogenat

Klon: UJ13A

Isotyp: IgG2a, kappa

Spezifität: Der Antikörper reagiert mit den 120 kDa-, 140 kDa- und 180 kDa-Isoformen des humanen Gehirns und mit der 125 kDa-Isoform des Muskels.

Hersteller: DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Anti-MHCn

Monoklonaler Mausantikörper

Immunogen: Myosin aus der Muskulatur eines drei Tage alten Kaninchens

Klon: WB-MHCn

Isotyp: IgG1

Spezifität: Der Antikörper reagiert mit dem MHCn des Kaninchens und des Menschen.

Hersteller: Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK

Anti-Myogenin

Monoklonaler Mausantikörper

Immunogen: Myogenin-Peptid (Aminosäuren 73-94), konjugiert an Hämocyanin- und Glutathion-S-Transferase-Fusionspeptid, das Myogenin enthält (Aminosäuren 30-224)

Klon: F5D

Isotyp: IgG1, kappa

Spezifität: Der Antikörper erkennt ein Epitop in der Aminosäurenregion 138-158 des Myogeninproteins in Myotuben und neonataler Muskulatur von Mensch, Maus und Ratte.

Hersteller: DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Anti-MyoD1

Monoklonaler Mausantikörper

Immunogen: rekombinantes murines Wild-Typ MyoD1-Protein

Klon: 5.8A

Isotyp: IgG1, kappa

Spezifität: Der Antikörper bindet ein Epitop zwischen den Aminosäuren 180-189 am carboxyterminalen Ende des MyoD1-Proteins.

Hersteller: DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Anti-Tenascin

Monoklonaler Mausantikörper

Immunogen: menschlicher Brusttumor

Klon: T2H5

Isotyp: IgG1

Spezifität: Der Antikörper erkennt Tenascin in normalem und hyperproliferativem menschlichem Gewebe.

Hersteller: Chemicon International, Kalifornien, USA

Anti-Vimentin

Monoklonaler Mausantikörper

Immunogen: gereinigtes Vimentin aus Schweineaugenlinsen

Klon: V9

Isotyp: IgG1, kappa

Spezifität: Der Antikörper reagiert mit 57 kDa-Vimentin.

Hersteller: DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Anti-MHCs

Monoklonaler Mausantikörper

Immunogen: Myosin aus Myofibrillen von histochemisch gemischter humaner Skelettmuskulatur

Klon: NOQ7.5.4D

Isotyp: IgG

Spezifität: Der Antikörper ist spezifisch für MHCS und markiert Typ-I-Fasern.

Hersteller: Chemicon International, Kalifornien, USA

2.2.3 Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper wurde polyklonales biotinyliertes Anti-mouse-Immunglobulin (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) verwendet. Dieses besteht aus biotinylierten F(ab')₂ Fragmenten von Anti-mouse-Immunglobulinen des Kaninchens und ist spezifisch für alle IgG und IgM der Maus.

2.2.4 Herstellung der Schnitte

Die im Stickstofftank bei -200 °C aufbewahrten Schnitte wurden vor dem Schneiden auf -20 °C erwärmt. Bei einer Temperatur von -20 °C wurden dann am Kryostaten vom Typ Microm HM 500 OMV (Seriennummer: 6857) serielle Schnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt und auf mit Silan beschichtete Objektträger aufgezogen.

Nach dem Schneiden wurden die Schnitte entweder sofort gefärbt oder in Aluminiumfolie verpackt und im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.5 Kontrollen

2.2.5.1 Negativkontrolle

Bei jeder immunhistochemischen Färbung wurde eine Negativkontrolle erstellt. Hierbei wurde auf einen Schnitt statt Primärantikörper die entsprechende Menge TBS-Pufferlösung aufgetragen. Bei den restlichen Arbeitsschritten der Färbung wurde mit der Negativkontrolle gleich verfahren wie mit den gefärbten Schnitten. Alle Negativkontrollen erwiesen sich als negativ.

2.2.5.2 Positivkontrolle

Bei der Färbung mit Anti-NCAM dienten Satellitenzellen und Nervenfasern als interne Positivkontrolle (siehe Abbildung 1). Alle untersuchten Schnitte wiesen dabei positive Satellitenzellen und teilweise zusätzlich positive Nervenfasern auf.

Bei der Färbung mit Anti-MHCn kam es nie vor, dass in einem Schnitt keine einzige Faser positiv war. Eine Positivkontrolle wurde nicht durchgeführt.

Für Anti-Vimentin diente die Anfärbung von Kapillaren als interne Positivkontrolle. Dabei zeigten alle mit Anti-Vimentin gefärbten Schnitte Vimentin-positive Kapillaren.

Für Anti-Tenascin wurde keine Positivkontrolle durchgeführt, doch zeigte bei jeder Färbeserie mindestens ein Schnitt Tenascin-positive Bereiche.

Für Anti-MHCs wurde ebenfalls keine Positivkontrolle durchgeführt, doch wiesen alle untersuchten Biopsien Typ-I-Fasern und damit positive Bereiche auf.

Für Anti-Myogenin wurde eine Biopsie mit der Diagnose „Myositis“ als Positivkontrolle verwendet. Ein Schnitt dieser Biopsie wurde bei jedem Färbevorgang mitgefärbt und zeigte stets Myogenin-positive Myotuben.

Für Anti-MyoD1 diente ebenfalls eine Biopsie mit „Myositis“ als Positivkontrolle. Hier wurde ebenso verfahren. Es zeigten sich ebenfalls bei jeder Färbung MyoD1-positive Myotuben.

2.2.5.3 Färbung mit Anti-Vimentin

Vimentin ist im Gegensatz zu MHCn und NCAM ein Marker, der spezifisch regenerierte Fasern und keine denervierten Fasern anfärbt (Winter und Bornemann, 1999). Vimentin ist auch dann noch positiv, wenn die Morphologie keine Identifizierung der Regeneration mehr erlaubt. Regenerierende Fasern sind nach Nekroseinduktion sieben Tage lang basophil (Schmalbruch, 1976), während sie 28 Tage lang Vimentin-positiv sind (Bornemann und Schmalbruch, 1992). Daher wurde eine Färbung mit Anti-Vimentin durchgeführt, um Regeneration in den verwendeten Biopsien auszuschließen. Keine der verwendeten Biopsien wies Vimentin-positive Muskelfasern auf.

2.2.5.4 Färbung mit Anti-MHCs

Die untersuchten Biopsien wurden mit Anti-MHCs gefärbt, welches Typ-I-Fasern anfärbt. Es konnte festgestellt werden, dass keine der untersuchten Biopsien Fasertypengruppierung aufwies.

2.2.6 Vorgehensweise bei den immunhistochemischen Färbungen

Fixierung

Die Schnitte wurden nach dem Schneiden luftgetrocknet, dann für fünf Minuten in Aceton fixiert und anschließend fünf Minuten in TBS hydriert.

Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität

Hierzu wurden die Schnitte für 15 min in einer Lösung aus 250 ml Methanol und 6 ml H₂O₂ inkubiert und danach jeweils 5 min in destilliertem Wasser und TBS gewaschen.

Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen

Hierzu wurden die Schnitte mit jeweils 100 µl Schweineserum (10%) bedeckt und 15 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Schweineserum-Lösung abgeklopft.

Primärantikörper

Auf die Schnitte wurden jeweils 100 µl Primärantikörper-Lösung gegeben (Verdünnung der einzelnen Antikörper siehe Tabelle 1). Auf die Negativkontrollen wurden statt dem Primärantikörper 100 µl TBS-BSA gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einem geschlossenen Kasten als Verdunstungsschutz.

Sekundärantikörper

Vor Auftragen des Sekundärantikörpers wurden die Schnitte für 5 min mit TBS gewaschen. Danach wurden jeweils 100 µl eines 1:400 mit TBS-BSA verdünnten Anti-mouse-Antikörpers als Sekundärantikörper aufgetragen und für 30 min inkubiert. Danach wurden die Schnitte für 5 min in TBS gewaschen.

AB-Komplex

Zur Herstellung der AB-Komplex-Lösung (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) wurden Lösung A (Avidin) und B (biotinylierte

Meerrettischperoxidase) im Verhältnis 1:1:200 mit TBS gemischt. Die fertige Lösung wurde für 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Danach wurden jeweils 100 µl auf die Schnitte gegeben und für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in TBS gewaschen.

DAB-Entwicklung

Die Schnitte wurden dann für 5 min im Dunkeln in DAB-Lösung entwickelt. Danach wurden sie für 5 min in TBS gewaschen.

Entwässerung

Zur Entwässerung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%igem Alkohol, 96%igem Alkohol, zweimal 100%igem Alkohol jeweils 2 min gewaschen und anschließend zweimal 5 min in Xylol gebadet.

Eindeckeln

Zum Eindeckeln wurde HICO-MIC Mikroskopiereinschlussmittel (Hirtz & Co., Köln) verwendet.

Tabelle 2: Verdünnung der einzelnen Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung
Anti-NCAM	1:100
Anti-MHCN	1:20
Anti-MHCS	1:200
Anti-MyoD1	1:50
Anti-Myogenin	1:25
Anti-Vimentin	1:25
Anti-Tenascin	1:100

Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

TBS

Zur Herstellung der TBS-Stammlösung wurden 60,6 g Tris-Base und 163,6 g NaCl in 1,5 Liter destilliertem Wasser gelöst und der pH mit 25%iger Salzsäure (HCl) auf 7,5 eingestellt. Danach wurde die Stammlösung mit destilliertem Wasser auf 2 Liter aufgefüllt.

Die bei den Färbungen verwendete TBS-Gebrauchslösung wurde aus der TBS-Stammlösung durch Verdünnung mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 und anschließende Einstellung des pH auf 6,0 hergestellt.

TBS-BSA

Die TBS-BSA-Lösung wurde hergestellt, indem 100 mg Albumin in 100 ml TBS-Gebrauchslösung gelöst wurden

ABC-Lösung

Zur Herstellung der ABC-Lösung wurden 5 µl Avidin und 5 µl Biotin mit 1 ml TBS-Gebrauchslösung verdünnt und vor Verwendung noch 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert.

Substratpuffer

Hierfür wurden 21 g Zitronensäure Monohydrat, 34 g Imidazole und 29,2 g NaCl mit 400 ml destilliertem Wasser aufgelöst, auf einen pH von 7,0 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

DAB

Die DAB-Lösung wurde hergestellt, indem 95 bis 100 mg DAB in 150 ml destilliertem Wasser, 20 ml Substratpuffer und 66,6 µl H₂O₂ (30%) gelöst wurden und auf 200 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurden. Vor Gebrauch wurde die DAB-Lösung filtriert.

2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Von allen Biopsien wurde zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbungen noch eine HE-Färbung durchgeführt. Dabei wurden die geschnittenen Präparate luftgetrocknet und für eine Minute in Hämatoxylin-Lösung gegeben. Anschließend wurden sie in Leitungswasser gespült, kurz in Eosin getaucht und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit den Alkoholkonzentrationen 70%, 80%, 96%, 100% und Xylol entwässert.

In der HE-Färbung färbt Hämatoxylin die aufgrund ihres DNA-Reichtums basophilen Zellkerne blau an, Eosin färbt das eosinophile Zytoplasma rot.

2.4 Auswertung

2.4.1 Analyse der immunhistochemisch positiven Fasern

Von allen verwendeten Biopsien wurden Schnitte mit Färbungen mit Anti-NCAM, Anti-MHCn, Anti-Myogenin, Anti-MyoD1 und Anti-Tenascin auf ihre Menge an positiven Fasern untersucht.

Dabei wurde ein Mikroskop vom Typ Polyvar (Reichert-Jung) verwendet, das mit 4-fach, 10-fach, 20-fach und 40-fach Objektiven ausgestattet war.

Auf jedem Schnitt wurde ein Areal von 200 Fasern untersucht und die Menge der positiven Fasern aufgetrennt in normal große, angulär-atrophe und kleine Fasern analysiert. Auf den verschiedenen Schnitten einer Biopsie wurde jeweils das gleiche Areal für die verschiedenen verwendeten Antikörper untersucht.

Aus der absoluten Menge an positiven Fasern wurde der prozentuale Anteil ermittelt.

In den Färbungen mit Anti-NCAM und Anti-MHCn wurden alle Fasern, deren Zytoplasma angefärbt war, als positiv gewertet, bei Anti-Myogenin und Anti-MyoD1 alle Fasern, die mindestens einen angefärbten Zellkern besaßen und in der Färbung mit Anti-Tenascin alle Fasern, bei denen die angrenzende Extrazellulärmatrix angefärbt war.

2.4.2 Statistik

Für die jeweiligen Färbungen (NCAM, MHCn, Myogenin) wurden nach morphologischen Kollektiven getrennt (normal große, angulär-atrophe und kleine Muskelfasern) die Anteile an positiv markierten Muskelfasern im Verhältnis zu der analysierten Gesamtfaserzahl gebildet. Die Expressionsraten für Tenascin in „akuten“ Fällen im Vergleich zu „chronisch“ pathologisch veränderten Biopsien wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Tests analysiert, da hier keine Normalverteilung der Daten vorlag. Als Signifikanzniveau wurde jeweils ein Wert von $\alpha=0,05$ gewählt. Multiples Testen wurde mit dem Bonferroni-Holm-Verfahren korrigiert. Zur Datenauswertung wurde das statistische Software-Programm JPM 7.0 (www.jmp.com) benutzt.

3. Ergebnisse

3.1 Morphologische Beobachtungen

In den untersuchten Biopsien unterscheiden sich die einzelnen Fasern hinsichtlich Form und Größe.

Es finden sich in allen Biopsien Fasern von normaler Größe und Form, wie sich auch in gesundem Muskel vorkommen.

In allen untersuchten Biopsien liegen außerdem angulär-atrophe Fasern vor, wie sie typisch für Biopsien mit neurogener Atrophie sind (Abbildung 9). Diese kommen in den einzelnen Biopsien in unterschiedlicher Zahl vor.

Weiterhin fallen kleine Muskelfasern auf, die in einigen Biopsien in Gruppen angeordnet sind, teilweise jedoch auch einzeln zwischen angulär-atropen und normal großen Muskelfasern liegen (Abbildungen 16 bis 19). Ihr Durchmesser beträgt unter 10 μm . In der HE-Färbung lassen sich diesen kleinen Fasern Kerne zuordnen.

Wir haben angestrebt, ein möglichst breites Spektrum an Biopsien mit neurogener Atrophie auf die Expression der verschiedenen Marker zu untersuchen. Daher haben wir Biopsien ausgewählt, in denen die verschiedenen Faserformen in unterschiedlicher Häufigkeit auftreten.

Es gibt Biopsien, in denen die meisten Fasern von normaler Form und Größe sind, sich nur wenige angulär-atrophe Fasern finden und kleine Fasern nur vereinzelt oder gar nicht vorkommen. Diese Biopsien zeigen meist auch wenig allgemeine Veränderungen, wie Fibrose oder Proliferation von Fettgewebe und ähneln noch dem Bild des gesunden Muskels. Wir haben diesen Typ der neurogenen Atrophie als „akut“ bezeichnet (Abbildung 11).

Demgegenüber kann man Biopsien stellen, in denen sich zahlreiche angulär-atrophe Fasern finden und reichlich kleine Fasern vorliegen. Diese Biopsien weichen sehr stark vom Bild des gesunden Muskels ab und weisen z.T. auch

allgemeine Veränderungen wie Fibrose auf. Diesen Typ der neurogenen Atrophie haben wir als „chronisch“ bezeichnet (Abbildung 12).

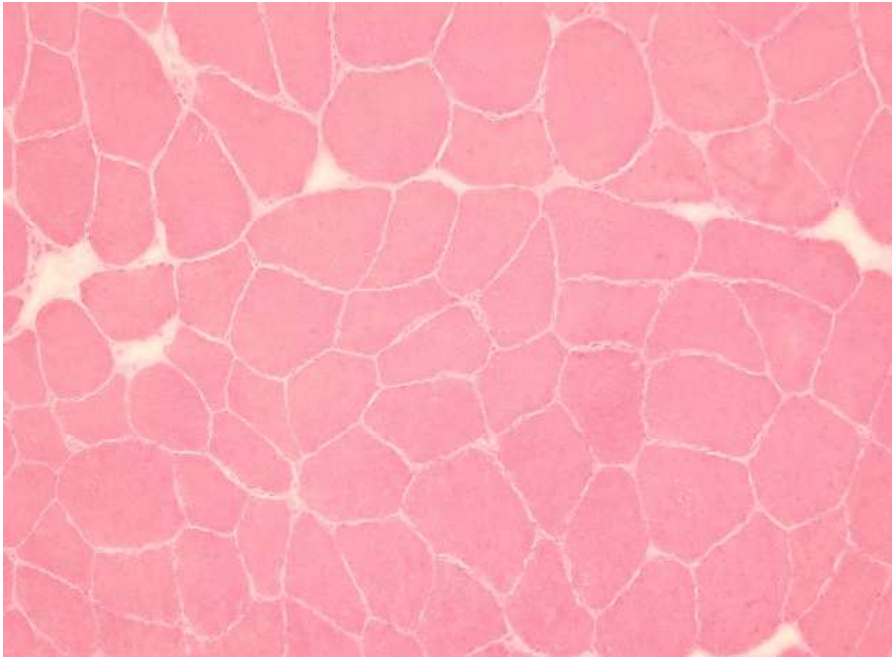


Abbildung 11:
HE-Färbung.
Beispiel für eine
Muskelbiopsie
vom „akuten“
Typ: Die
Muskelfasern
unterscheiden
sich in Form und
Größe nur wenig
von normaler
Muskulatur.

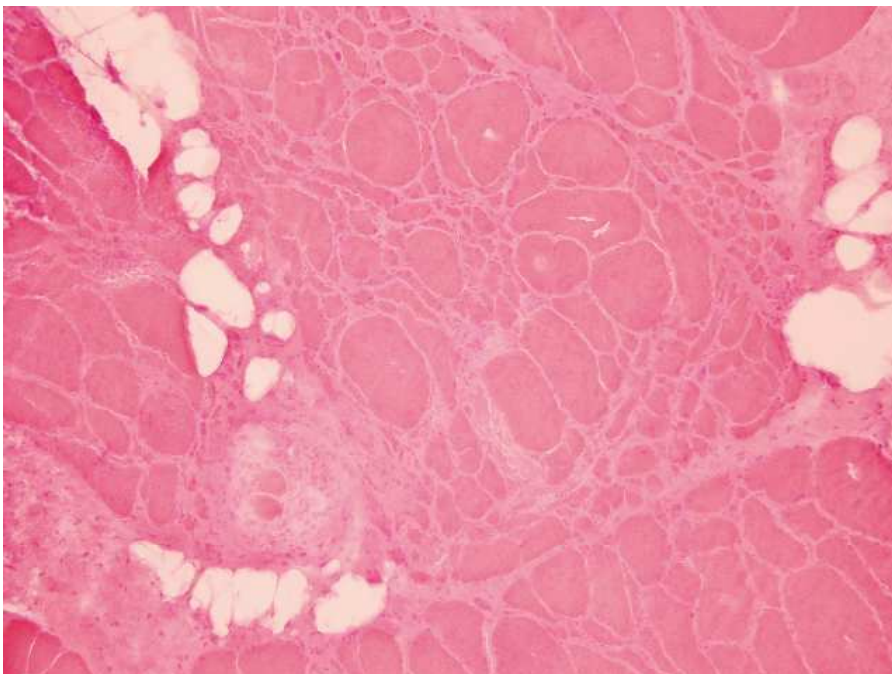


Abbildung 12: HE-
Färbung. Beispiel
für eine
Muskelbiopsie vom
„chronischen“ Typ:
Es finden sich
mehr angulär-
atrophe und kleine
Fasern als große
Fasern. Die
Biopsie weicht
durch Fibrose und
Einbau von
Fettzellen
morphologisch
stark von normaler
Muskulatur ab.

3.2 Angulär-atrophe Fasern

3.2.1 Vergleich der durchschnittlichen Menge an positiven angulär-atropen Fasern und der Häufigkeitsverteilung für die verschiedenen Marker (NCAM, MHCn, Myogenin)

3.2.1.1 NCAM

Die Häufigkeit der NCAM-positiven angulär-atropen Fasern ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Anteil NCAM-positiver Fasern von angulär-atropen Fasern insgesamt

NCAM	0% von Fasern positiv	1-33% von Fasern positiv	34-66% von Fasern positiv	67-100% von Fasern positiv	Durchschnittliche Anzahl an positiven angulär-atropen Fasern bezogen auf Gesamtzahl an angulär-atropen Fasern
Angulär-atrophe positive Fasern	4 Biopsien ⇒ 6,1%	29 Biopsien ⇒ 43,9%	28 Biopsien ⇒ 42,4%	5 Biopsien ⇒ 7,6%	33,0% (95%-Konfidenzintervall: 27,4-38,6%)

Es finden sich viele NCAM-negative angulär-atrophe Fasern (Abbildung 13a). Die Menge der NCAM-negativen angulär-atropen Fasern unterscheidet sich in den einzelnen Biopsien stark und reicht von 0 bis 100%.

3.2.1.2 MHCn

Die Häufigkeit der MHCn-positiven angulär-atropen Fasern ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Anteil MHCn-positiver Fasern an angulär-atropen Fasern

MHCn	0% von Fasern positiv	1-33% von Fasern positiv	34-66% von Fasern positiv	67-100% von Fasern positiv	Durchschnittliche Anzahl an positiven angulär-atropen Fasern (Rest positiv)
Angulär-atrophe positive Fasern	3 Biopsien ⇒ 4,6%	28 Biopsien ⇒ 43,1%	29 Biopsien ⇒ 44,6%	5 Biopsien ⇒ 7,7%	36,4% (95%-KI: 31,0- 41,8%)

Auch für MHCn finden sich sehr viele negative angulär-atrophe Fasern. Die einzelnen Biopsien unterscheiden sich in der Anzahl der MHCn-negativen angulär-atropen Fasern stark und liegen in einem Bereich von 17,9% bis 100%.

Die Menge an MHCn-positiven und NCAM-positiven angulär-atropen Fasern unterscheidet sich nicht signifikant ($p=0,28$). Es liegen durchschnittlich nur geringfügig mehr MHCn-positiv als NCAM-positiv angulär-atrophe Fasern vor (Diagramm 1).

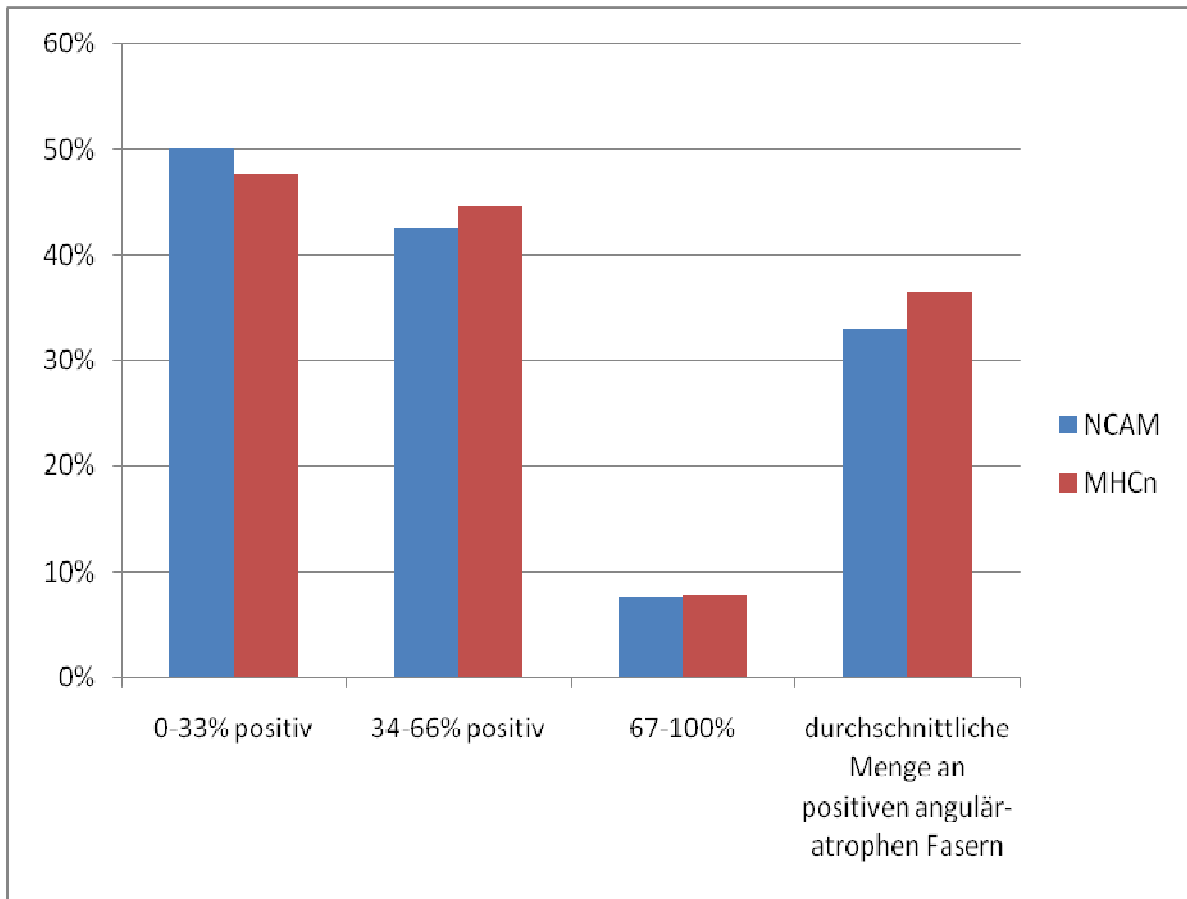


Diagramm 1: Vergleich der Menge der NCAM- mit der Menge der MHCn-positiven angulär-atrophischen Fasern: Auf der y-Achse ist der Prozentsatz der Biopsien, die in die entsprechende Kategorie gehören, aufgetragen. Die Verteilung von NCAM und MHCn auf die Prozentbereiche und auch die durchschnittliche Menge an positiven angulär-atrophischen Fasern stimmt fast überein.

3.2.1.3 Myogenin

Die Häufigkeit der Myogenin-positiven angulär-atrophen Fasern ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 5: Anteil Myogenin-positiver Fasern an angulär-atrophen Fasern

Myogenin	0% von angulär-atrophen Fasern positiv	1-33% von angulär-atrophen Fasern positiv	34-66% von angulär-atrophen Fasern positiv	67-100% von angulär-atrophen Fasern positiv	Mittelwert
positive angulär-atrophe Fasern	37 Biopsien ⇒ 57,8%	9 Biopsien ⇒ 14,1%	10 Biopsien ⇒ 15,6%	8 Biopsien ⇒ 12,5%	18,0 % (95%-KI: 10,8- 25,2%)

Vergleicht man das Vorkommen von NCAM und MHCn mit dem von Myogenin, so fallen deutliche Unterschiede auf: Während es kaum Biopsien gibt, in denen keine NCAM- und keine MHCn-positiven Fasern vorkommen, finden sich in über der Hälfte der Biopsien keine Myogenin-positiven Fasern (Tabelle 6, Diagramm 2).

Betrachtet man nur die Biopsien, in denen Myogenin-positiv angulär-atrophe Fasern vorkommen, fällt jedoch auf, dass häufig ein im Vergleich zu NCAM und MHCn hoher Prozentsatz positiv ist. (Tabellen 3-5) (Abbildung 15).

Tabelle 6: Anzahl der Biopsien, in denen 0% der angulär-atrophen Fasern positiv sind

	NCAM	MHCn	Myogenin
Anzahl der Biopsien, in denen 0% der angulär-atrophen Fasern positiv sind	4 Biopsien (entspricht 6,1%)	3 Biopsien (entspricht 4,6%)	37 Biopsien (entspricht 57,8%)

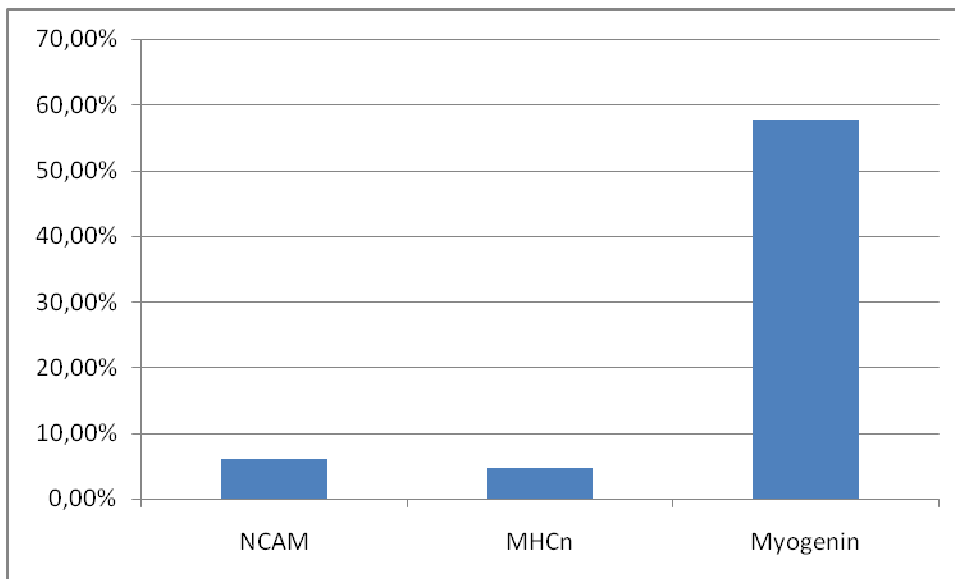
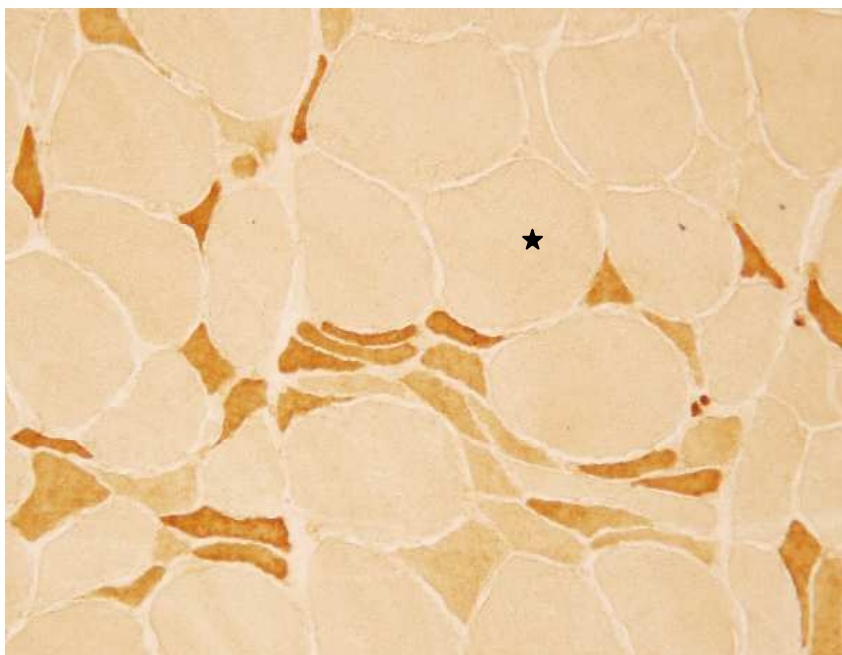


Diagramm 2: Prozentsatz der Biopsien, in denen 0% der angulär-atrophen Fasern positiv sind: Es gibt deutliche mehr Biopsien, in denen keine Myogenin-positiven angulär-atrophen Fasern vorkommen, als Biopsien, in denen keine NCAM- oder MHCn-positiven angulär-atrophen Fasern vorliegen.



a



b

Abbildung 13: a: Färbung mit Anti-NCAM: Es sind zahlreiche negative angulär-atrophe Fasern zu sehen, drei normal große Fasern sind positiv; b: gleiche Stelle in der Färbung mit MHCn, der Stern markiert korrespondierende Fasern: im Gegensatz zur Färbung mit Anti-NCAM sind einige der angulär-atropen Fasern positiv, die drei NCAM-positiven normal großen Fasern hingegen sind MHCn-negativ.

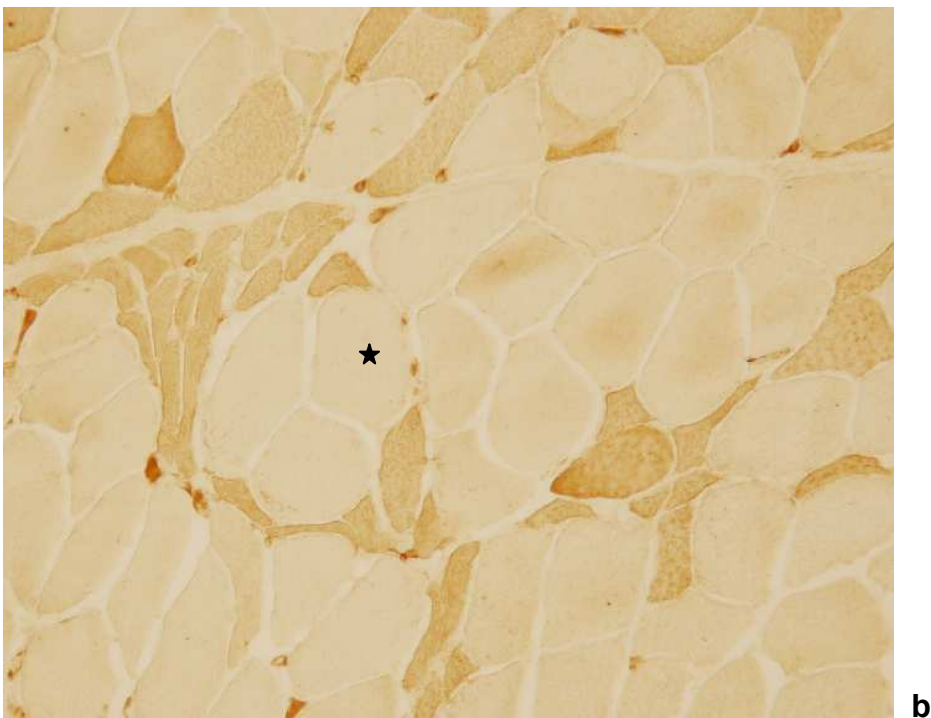


Abbildung 14: Färbung mit Anti-NCAM (Bild a) und Anti-MHCn (Bild b): In Bild a und b sind fast immer die gleichen Fasern NCAM- und MHCn-positiv. Der Stern markiert korrespondierende Fasern.

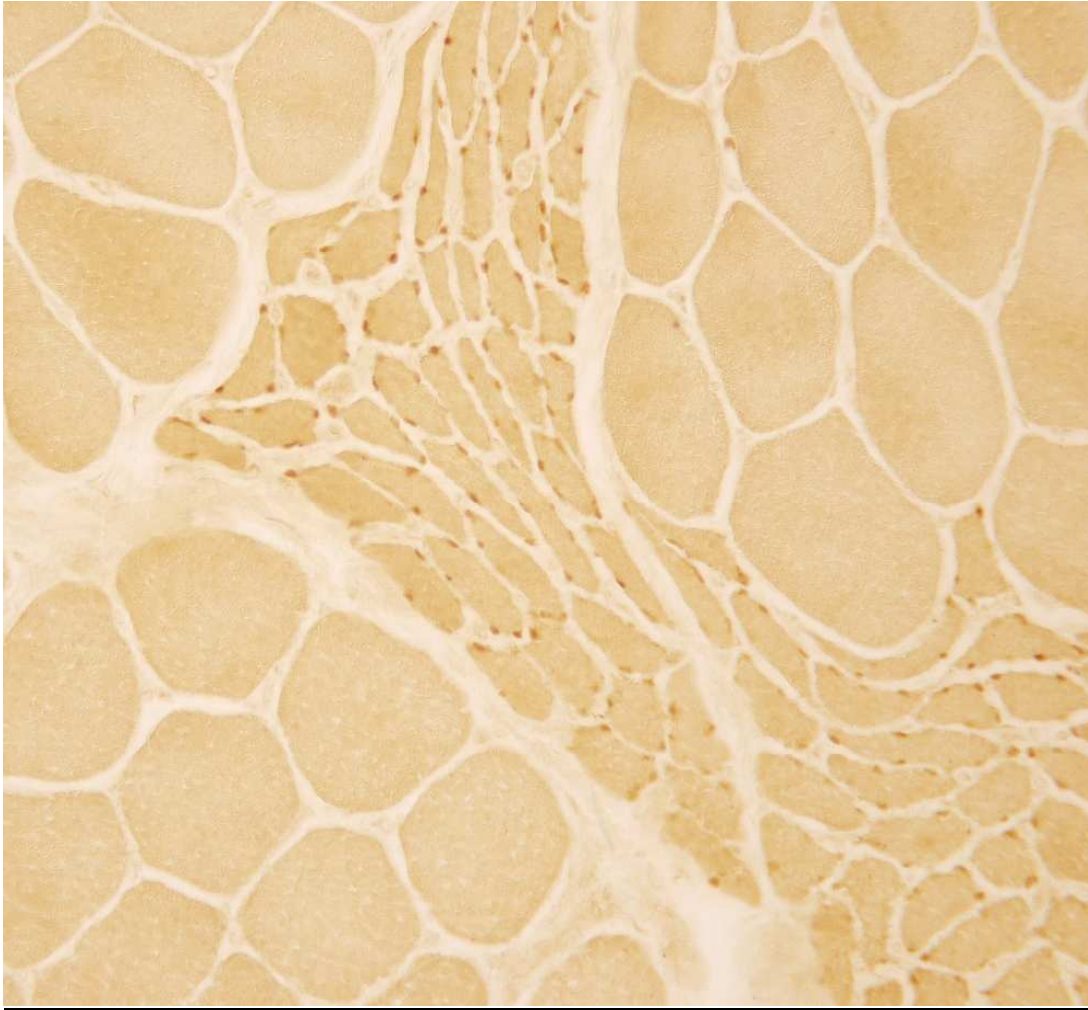


Abbildung 15: Färbung mit Anti-Myogenin: Feld von angulär-atrophen Fasern. Alle angulär-atrophen Fasern des Feldes sind Myogenin-positiv.

3.2.2 Vergleich der Menge an positiven angulär-atrophen Fasern in den einzelnen Biopsien für die verschiedenen Marker (NCAM, MHCn, Myogenin)

Betrachtet man nur die durchschnittlichen Werte der für NCAM bzw. MHCn positiven angulär-atrophen Fasern, so sind kaum Unterschiede zwischen den beiden Markern erkennbar. Sowohl in der durchschnittlichen Menge der positiven angulär-atrophen Fasern als auch in der Verteilung der Biopsien auf die Prozentbereiche an positiven Fasern stimmen NCAM und MHCn beinahe überein (Diagramm 1). Myogenin hingegen weicht von NCAM und MHCn ab: Es gibt häufiger Biopsien, in denen keine Myogenin-positiven angulär-atrophen

Fasern vorkommen. In den Biopsien, in denen Myogenin vorkommt, ist jedoch meist ein großer Teil der angulär-atrophischen Fasern positiv (Abbildung 15).

Vergleicht man die Menge der für die verschiedenen Marker positiven angulär-atrophischen Fasern jedoch in den einzelnen Biopsien, so fallen auch im Vergleich von NCAM und MHCn Unterschiede auf. In den einzelnen Biopsien ähnelt sich die Anzahl der NCAM- und der MHCn-positiven angulär-atrophischen Fasern keineswegs immer. Es gibt einige Biopsien, in denen die Menge der NCAM-positiven angulär-atrophischen Fasern überwiegt, in anderen Biopsien überwiegt die Menge der MHCn-positiven angulär-atrophischen Fasern (Abbildung 13). Die Diagramme 3 bis 5 zeigen die unterschiedliche Menge der für die verschiedenen Marker positiven angulär-atrophischen Fasern in den einzelnen Biopsien. Es fällt auf, dass die Werte der einzelnen Marker häufig weit voneinander abweichen und keiner klaren Gesetzmäßigkeit folgen.

Betrachtet man die Menge der Myogenin-positiven Fasern in den einzelnen Biopsien, so fällt auf, dass in vielen Biopsien gar keine Myogenin-positiven Fasern vorkommen. Allerdings gibt es mehr Biopsien, in denen sehr viele Myogenin-positiv angulär-atrophische Fasern (>80%) vorkommen, als es Biopsien gibt, in denen sehr viele NCAM- oder MHCn-positiv angulär-atrophischen Fasern vorkommen (Diagramme 3 bis 5).

Betrachtet man jedoch die einzelnen Marker genau nach aufsteigender Menge an angulär-atrophischen Fasern, so fallen teilweise Zusammenhänge zwischen den Markern auf:

In Diagramm 3 sind die Biopsien nach aufsteigender Menge an MHCn-positiven angulär-atrophischen Fasern geordnet. Die Werte für NCAM und Myogenin folgen nicht den aufsteigenden MHCn-Werten, stehen also nicht in direktem Zusammenhang mit MHCn. Es fällt jedoch auf, dass in dem Bereich, wo die Werte für MHCn noch relativ niedrig sind, häufiger 0% an Myogenin-positiven angulär-atrophischen Fasern vorkommen als im dem Bereich, in dem MHCn höhere Werte annimmt. Doch auch in Biopsien mit hohen Werten für MHCn-positiven

angulär-atrophe Fasern liegen teilweise keine Myogenin-positiven angulär-atrophen Fasern vor.

Diagramm 4 zeigt die Werte der positiven angulär-atrophen Fasern für die einzelnen Marker nach aufsteigender Menge der Myogenin-positiven angulär-atrophen Fasern an. Es fällt auf, dass in den Biopsien mit 0% Myogenin-positiven angulär-atrophen Fasern MHCn häufiger niedrige Werte annimmt als in Biopsien, in denen Myogenin-positiv angulär-atrophe Fasern vorkommen. Desweiteren fällt auf, dass NCAM sich in den Fällen, in denen Myogenin-positiv angulär-atrophe Fasern vorkommen, auf einen engeren Bereich konzentriert als in Fällen, in denen die Myogenin-positiven angulär-atrophen Fasern den Wert 0% annehmen. Hier sind die Werte für NCAM breiter gestreut und konzentrieren sich weniger eng um den Durchschnittswert (ca. 33 % der angulär-atrophen Fasern positiv).

In Diagramm 5 sind die Biopsien nach aufsteigenden Werten der NCAM-positiven angulär-atrophen Fasern angeordnet. Hier ist zu sehen, dass in dem Bereich, in dem die Werte für NCAM eher niedrig sind und in dem Bereich, in dem sie eher hoch sind, häufiger 0% an Myogenin-positiven angulär-atrophen Fasern vorkommen als in dem Bereich, in dem NCAM eine mittlere Menge an positiven angulär-atrophen Fasern zeigt. Außerdem nimmt MHCn, wenn NCAM einen sehr niedrigen Wert annimmt, auch einen eher niedrigen Wert an. Eine direkte Assoziation zwischen NCAM und MHCn ist jedoch nicht ersichtlich.

Diagramm 6 zeigt die durchschnittlichen Werte der für die einzelnen Marker positiven angulär-atrophen Fasern: Die Menge der MHCn und der NCAM-positiven angulär-atrophen Fasern unterscheidet sich nicht signifikant ($p=0,28$), während für Myogenin signifikant weniger angulär-atrophe Fasern positiv sind als für NCAM ($p=0,0011$) und MHCn ($p<0,0001$).

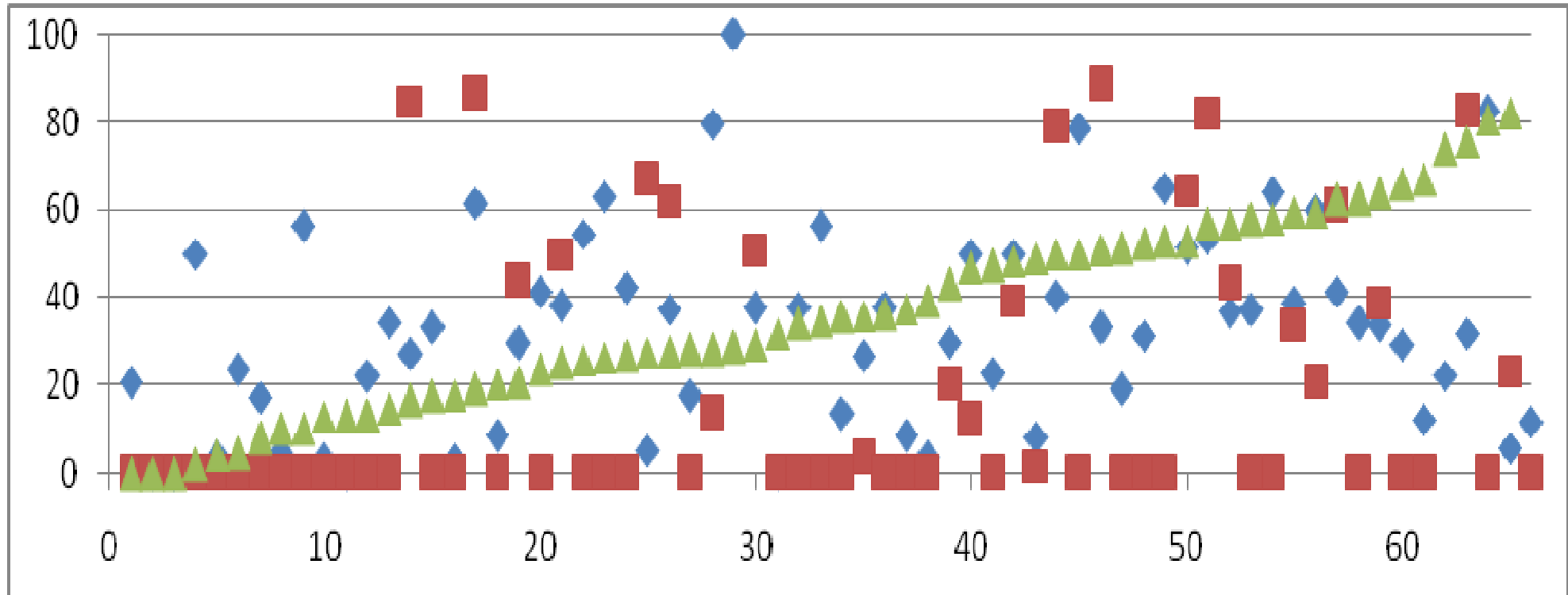


Diagramm 3: Verteilung der Prozentwerte der für einen bestimmten Marker positiven angular-atropen Fasern (y-Achse) in den einzelnen Biopsien (x-Achse: einzelne Biopsien, angeordnet in nach Menge der MHCn-positiven angular-atropen Fasern in aufsteigender Reihenfolge); rotes Quadrat: Myogenin; blaue Raute: NCAM; grünes Dreieck: MHCn: In Biopsien mit wenig MHCn ist Myogenin häufiger negativ als in Biopsien mit viel MHCn.

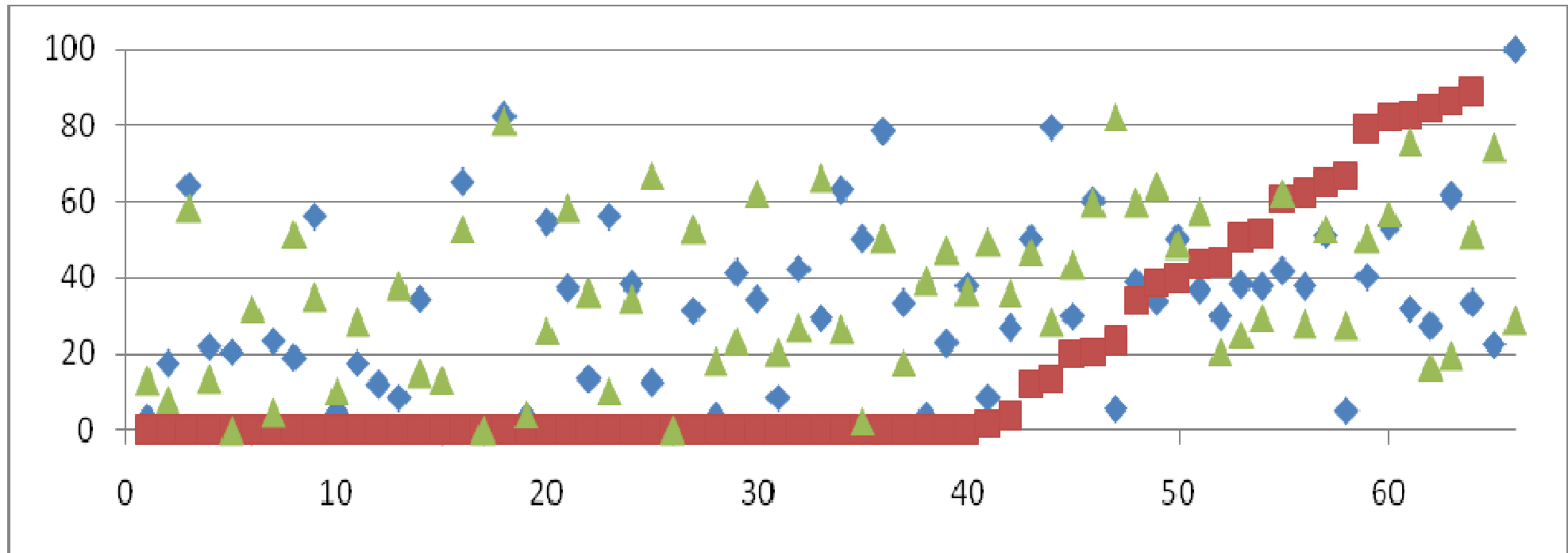


Diagramm 4: Verteilung der Prozentwerte der für einen bestimmten Marker positiven angulär-atrophen Fasern (y-Achse) in den einzelnen Biopsien (x-Achse: einzelne Biopsien, angeordnet in nach Menge der Myogenin-positiven angulär-atrophen Fasern in aufsteigender Reihenfolge); rotes Quadrat: Myogenin; blaue Raute: NCAM; grünes Dreieck: MHCn: In den Biopsien, in denen keine Myogenin-positiven Fasern vorkommen, findet sich häufiger wenig MHCn als in den Biopsien, in denen mehr Myogenin vorkommt. In den Biopsien, in denen sich Myogenin-positiv angulär-atrophe Fasern finden, liegt NCAM meist im mittleren Bereich, während es in Myogenin-negativen Biopsien eher vorkommt, dass sich sehr wenige oder sehr viele NCAM-positive angulär-atrophe Fasern finden.

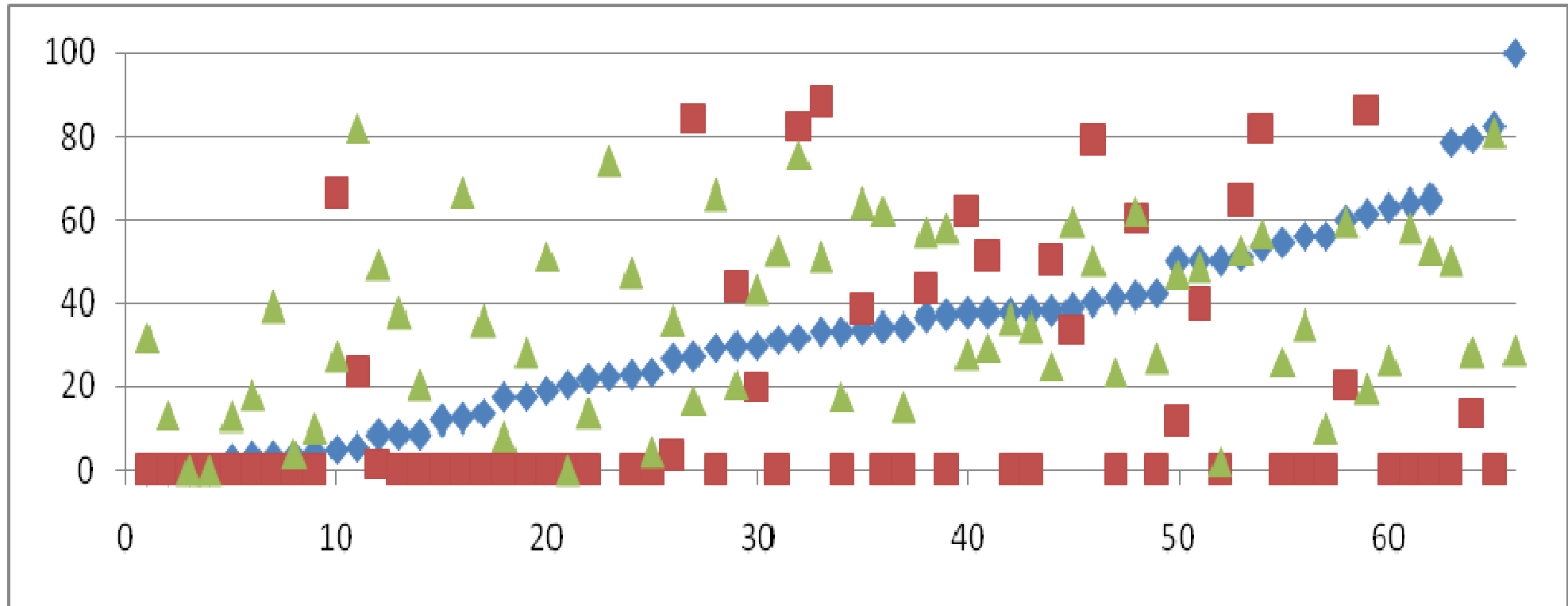


Diagramm 5: Verteilung der Prozentwerte der für einen bestimmten Marker positiven angulär-atropen Fasern (y-Achse) in den einzelnen Biopsien (x-Achse: einzelne Biopsien, angeordnet nach Menge der NCAM-positiven angulär-atropen Fasern in aufsteigender Reihenfolge); rotes Quadrat: Myogenin; blaue Raute: NCAM; grünes Dreieck: MHCn: In Biopsien mit wenig NCAM und in Biopsien mit viel NCAM finden sich häufiger nur Myogenin-negative angulär-atrophe Fasern als in Biopsien mit einer mittleren Menge an NCAM-positiven angulär-atropen Fasern.

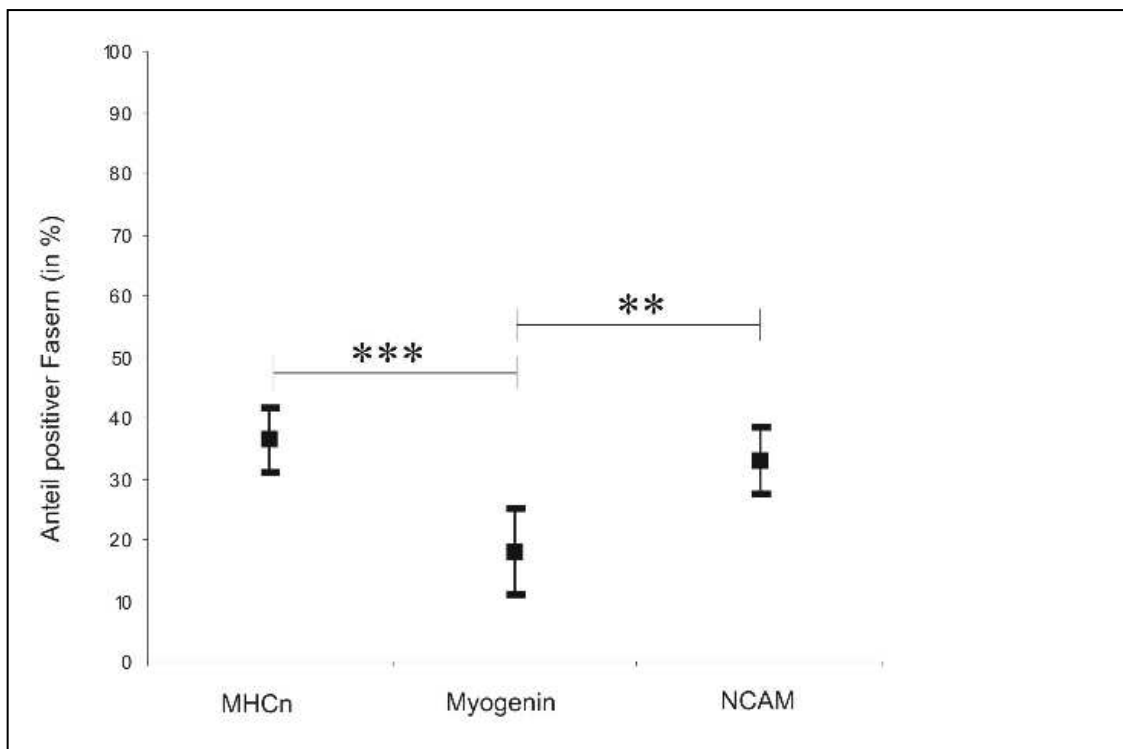


Diagramm 6: Menge der für die einzelnen Marker durchschnittlich positiven angulär-atropen Fasern in Prozent mit 95%-Konfidenzintervall. Für NCAM und MHCn sind signifikant mehr angulär-atrophe Fasern positiv als für Myogenin. Die Analyse erfolgte mit gepaartem t-Test (** $0,0001 < p < 0,01$; *** $p < 0,0001$).

3.2.2.1 Biopsien mit mehr MHCn-positiven angulär-atropen Fasern als NCAM-positiven angulär-atropen Fasern

In einigen Biopsien kommen deutlich mehr MHCn-positive angulär-atrophe Fasern vor als NCAM-positive angulär-atrophe Fasern (Abbildung 13). Diese Gruppe kann man weiter unterteilen in Biopsien mit wenig NCAM-positiven angulär-atropen Fasern und in Biopsien mit vielen MHCn-positiven angulär-atropen Fasern.

Betrachtet man die Gruppen getrennt voneinander, so fällt auf, dass die Biopsien mit wenig NCAM-positiven angulär-atropen Fasern und einer durchschnittlichen Menge an MHCn-positiven angulär-atropen Fasern meist eher vom „akuten“ Typ sind. Es kommen hier außerdem seltener Myogenin-positive Fasern vor.

Die Biopsien, in denen viele MHCn-positive angulär-atrophe Fasern vorliegen und eine mittlere Menge an NCAM-positiven angulär-atrophen Fasern, sind häufiger vom „chronischen Typ“. Es finden sich häufiger Myogenin-positive Fasern (Tabelle 7).

Tabelle 7: Auflistung aller Biopsien, in denen die Menge der MHCn-positiven angulär-atrophen Fasern > 25% über der Menge der NCAM-positiven angulär-atrophen Fasern liegt und ihrer Merkmale.

Merkmale	Biopsien mit wenig NCAM	Biopsien mit viel MHCn	Alle untersuchten Biopsien
Gesamtzahl der Biopsien	9 (entspricht 100%)	7 (entspricht 100%)	66
Anzahl „akuter“ Fälle	6 (entspricht 66,7%)	1 (entspricht 14,3%)	35 (entspricht 53,0%)
Anzahl „chronischer“ Fälle	3 (entspricht 33,3%)	6 (entspricht 85,7%)	31 (entspricht 47,0%)
Biopsien mit weniger als 5% Myogenin-positiven angulär-atrophen Fasern	8 (entspricht 88,9%)	3 (entspricht 42,9%) (bei einer Biopsie war Myogenin nicht zu beurteilen)	39 (entspricht 60,9%) (bei zwei Biopsien war Myogenin nicht zu beurteilen)
Biopsien mit mehr als 5% Myogenin-positiven angulär-atrophen Fasern	1 (entspricht 11,1%)	3 (entspricht 42,9%) (bei einer Biopsie war Myogenin nicht zu beurteilen)	25 (entspricht 39,1%) (bei zwei Biopsien war Myogenin nicht zu beurteilen)

3.2.2.2 Biopsien mit mehr NCAM-positiven angulär-atropen Fasern als MHCn-positiven angulär-atropen Fasern

In einigen Biopsien finden sich deutlich mehr NCAM-positive angulär-atrophe Fasern als MHCn-positive angulär-atrophe Fasern. Vergleicht man diese Biopsien mit anderen Biopsien, für die dies nicht der Fall ist, so fällt auf, dass diese Biopsien häufiger dem Typ „akut“ zugeordnet werden können. Myogenin weisen diese Biopsien selten auf (Tabelle 8). Bei einer Unterteilung dieser Biopsien in Fälle mit besonders viel NCAM und Fälle mit besonders wenig MHCn fallen keine Unterschiede auf.

Tabelle 8: Auflistung aller Biopsien, in denen die Menge der NCAM-positiven angulär-atropen Fasern > 25% über der Menge der MHCn-positiven angulär-atropen Fasern liegt und ihrer Merkmale

Merkmale	Biopsien mit NCAM > MHCn bei angulär-atropen Fasern	Alle untersuchten Biopsien
Anzahl Biopsien	8	66
Anzahl „akuter“ Fälle	5 (entspricht 62,5%)	35 (entspricht 53,0%)
Anzahl „chronischer“ Fälle	3 (entspricht 37,5%)	31 (entspricht 47,0%)
Biopsien mit weniger als 5% Myogenin-positiven angulär-atropen Fasern	6 (entspricht 75%) (bei einer Biopsie war Myogenin nicht zu beurteilen)	39 (entspricht 60,9%) (bei zwei Biopsien war Myogenin nicht zu beurteilen)
Biopsien mit mehr als 5% Myogenin-positiven angulär-atropen Fasern	1 (entspricht 12,5%) (bei einer Biopsie war Myogenin nicht zu beurteilen)	25 (entspricht 39,1%) (bei zwei Biopsien war Myogenin nicht zu beurteilen)

3.2.2.3 Biopsien mit etwa gleich viel NCAM- und MHCn-positiven angulär-atrophen Fasern

In einigen Biopsien entspricht die Menge der NCAM-positiven angulär-atrophen Fasern etwa der Menge der MHCn-positiven angulär-atrophen Fasern (Abbildung 14). Diese Gruppen kann man wiederum unterteilen in Biopsien mit insgesamt vielen NCAM- und MHCN-positiven angulär-atrophen Fasern und in Biopsien mit insgesamt wenigen NCAM- und MHCn-positiven angulär-atrophen Fasern.

Betrachtet man die Biopsien mit wenig NCAM- und wenig MHCn-positiven angulär-atrophen Fasern, so fällt auf, dass diese meist vom „akuten“ Typ sind und eher wenig Myogenin-positive Fasern aufweisen.

Im Vergleich dazu sind die Biopsien mit vielen NCAM- und vielen MHCn-positiven angulär-atrophen Fasern häufiger vom „chronischen“ Typ und weisen auch häufiger Myogenin-positive Fasern auf (Tabelle 9).

Tabelle 9: Auflistung aller Biopsien, in denen die Menge der NCAM-positiven angulär-atrophen Fasern < 10% über oder unter der Menge der MHCn-positiven angulär-atrophen Fasern liegt und ihrer Merkmale

Merkmale	Biopsien mit weniger als 35% NCAM-/MHCn- positive Fasern	Biopsien mit mehr als 35% NCAM/MHCn- positive Fasern	Alle untersuchten Biopsien
Anzahl untersuchte Biopsien	11	10	66
Anzahl „akuter“ Fälle	8 (entspricht 72,7%)	2 (entspricht 20%)	35 (entspricht 53,0%)
Anzahl „chronischer“ Fälle	3 (entspricht 27,3%)	8 (entspricht 80%)	31 (entspricht 47,0%)

Biopsien mit weniger als 5% Myogenin-positiven angulär-atrophischen Fasern	7 (entspricht 63,6%)	4 (entspricht 40%)	39 (entspricht 60,9%) (bei zwei Biopsien war Myogenin nicht zu beurteilen)
Biopsien mit mehr als 5% Myogenin-positiven angulär-atrophischen Fasern	4 (entspricht 36,4%)	6 (entspricht 60%)	25 (entspricht 39,1%) (bei zwei Biopsien war Myogenin nicht zu beurteilen)

3.3 Verteilungsmuster der einzelnen Marker

Betrachtet man das Verteilungsmuster der positiven Fasern auf den Schnitten, so fallen auch hier Unterschiede zwischen NCAM und MHCn auf der einen Seite und Myogenin auf der anderen Seite auf.

3.3.1 Verteilung der für die einzelnen Marker positiven Fasern auf dem gesamten Schnitt

Während die NCAM- und MHCn-positiven Fasern meist gleichmäßig über den Schnitt verteilt sind, liegen die Myogenin-positiven Fasern häufig in Gruppen vor und kommen teilweise in einem Bereich des Schnittes lokal gehäuft vor, ohne dass eine Assoziation mit dem Vorkommen von NCAM oder MHCn in diesem Bereich besteht (Tabelle 10) (Abbildungen 15 und 16).

3.3.2 Vorkommen der einzelnen Markern in Feldern mit kleinen Fasern

In einigen Biopsien finden sich Bereiche, in denen kleine Fasern felderartig nebeneinander liegen.

Stets sind von diesen kleinen Fasern alle oder die überwiegende Anzahl MHCn-positiv (Tabelle 10) (Abbildung 17).

In einigen Biopsien sind die meisten Fasern dieser Felder NCAM-negativ, in anderen Biopsien NCAM-positiv. Nur in fünf Biopsien von insgesamt 23 Biopsien findet man gleichzeitig Felder mit überwiegend NCAM-positiven kleinen Fasern und Felder mit überwiegend NCAM-negativen kleinen Fasern. Dass alle kleinen Fasern eines Feldes NCAM-positiv sind, kommt nicht vor (Tabelle 9).

Betrachtet man diese Felder mit kleinen Fasern in der Färbung mit Anti-Myogenin, so fällt auf, dass fast gleich häufig Felder vorkommen, in denen alle Fasern Myogenin-negativ sind, Felder, in denen die überwiegende Anzahl der Fasern Myogenin negativ ist und Felder, in denen alle Fasern Myogenin positiv sind (Abbildung 13). Unterscheidet man die Kategorien „alle Fasern positiv“, „überwiegende Anzahl der Fasern positiv“ und „alle Fasern negativ“, so kommen in drei Biopsien alle drei Kategorien innerhalb einer Biopsie vor, in sieben Biopsien kommen zwei Kategorien innerhalb einer Biopsie vor. In fünf Biopsien kommt nur eine dieser Kategorie vor, wobei zu berücksichtigen ist, dass in zwei dieser fünf Biopsien auch nur ein Feld mit kleinen Fasern vorkommt.

Man kann somit sagen, dass sich die Verteilung der Myogenin-positiven Fasern innerhalb der Felder mit kleinen Fasern im Gegensatz zur Verteilung der NCAM- und MHCn-positiven Fasern von Feld zu Feld unterscheidet. MHCn zeigt relativ konstant einen hohen Anteil an positiven Fasern in den Feldern mit kleinen Fasern, während NCAM zwar Unterschiede zwischen den einzelnen Biopsien zeigt, innerhalb einer Biopsie jedoch nur selten.

3.3.3 Vorkommen der einzelnen Marker in Feldern mit angulär-atrophe Fasern

In einigen Biopsien finden sich Bereiche, in denen angulär-atrophe Fasern felderartig nebeneinander liegen (Abbildungen 15 und 16).

Die meisten dieser angulär-atrophe Fasern sind NCAM-negativ (Abbildung 16). Nur in drei Biopsien finden sich Felder, in denen die überwiegende Zahl der angulär-atrophe Fasern positiv ist. Dass alle angulär-atrophe Fasern eines Feldes NCAM-positiv sind, kommt nicht vor (Tabelle 10).

Für MHCn hingegen sind diese in Feldern angeordneten angulär-atrophe Fasern häufiger positiv. In 17 Biopsien finden sich Felder, in denen alle oder die überwiegende Zahl der angulär-atrophe Fasern MHCn-positiv sind. Davon liegen in 15 Biopsien nur solche Felder vor und keine Felder, in denen die meisten angulär-atrophe Fasern negativ sind. Nur in zwei Biopsien finden sich zugleich Felder mit angulär-atrophe Fasern, in denen die überwiegende Zahl der angulär-atrophe Fasern negativ ist und Felder, in denen die überwiegende Zahl der angulär-atrophe Fasern positiv ist (Tabelle 10).

Während für MHCn meist nur die überwiegende Zahl der angulär-atrophe Fasern eines Feldes, weniger häufig alle angulär-atrophe eines Feldes positiv sind, ist dies bei Myogenin umgekehrt: Es kommt häufiger vor, dass alle angulär-atrophe Fasern eines Feldes ohne Ausnahme Myogenin-positiv sind (Abbildungen 15 und 16), als dass sich in einem Feld einzelne Myogenin-negative angulär-atrophe Fasern finden. Doch auch Felder, in denen fast alle Fasern Myogenin-negativ sind, kommen vor. Wie schon bei den Feldern mit kleinen Fasern, finden sich auch hier häufig unterschiedliche Verteilungen der Menge der Myogenin-positiven angulär-atrophe Fasern in den verschiedenen Feldern innerhalb einer Biopsie. Betrachtet man auch hier die Kategorien „alle Fasern positiv“, „überwiegende Zahl der Fasern positiv“ und „alle Fasern negativ“, so kommen von 9 Biopsien in drei Biopsien nur Felder einer Kategorie vor. In vier Biopsien finden sich zwei Kategorien und in zwei Biopsien sogar alle drei Kategorien innerhalb einer Biopsie. In drei Biopsien finden sich gleichzeitig die Kategorien „alle Fasern positiv“ und „alle Fasern negativ“ (Tabelle 10).

Man kann somit sagen, dass sich Myogenin von NCAM und MHCn vor allem dahingehend unterscheidet, dass in den Feldern einer Biopsie selten eine einheitliche Menge an Fasern positiv ist. Stattdessen finden sich in den einzelnen Feldern mit angulär-atrophen Fasern in einer Biopsie teilweise völlig unterschiedliche Mengen an positiven Fasern. Außerdem fällt auf, dass häufig alle Fasern eines Feldes mit angulär-atrophen Fasern Myogenin positiv sind (Abbildung 13), während dies für MHCn seltener und für NCAM nie der Fall ist (Tabelle 10).

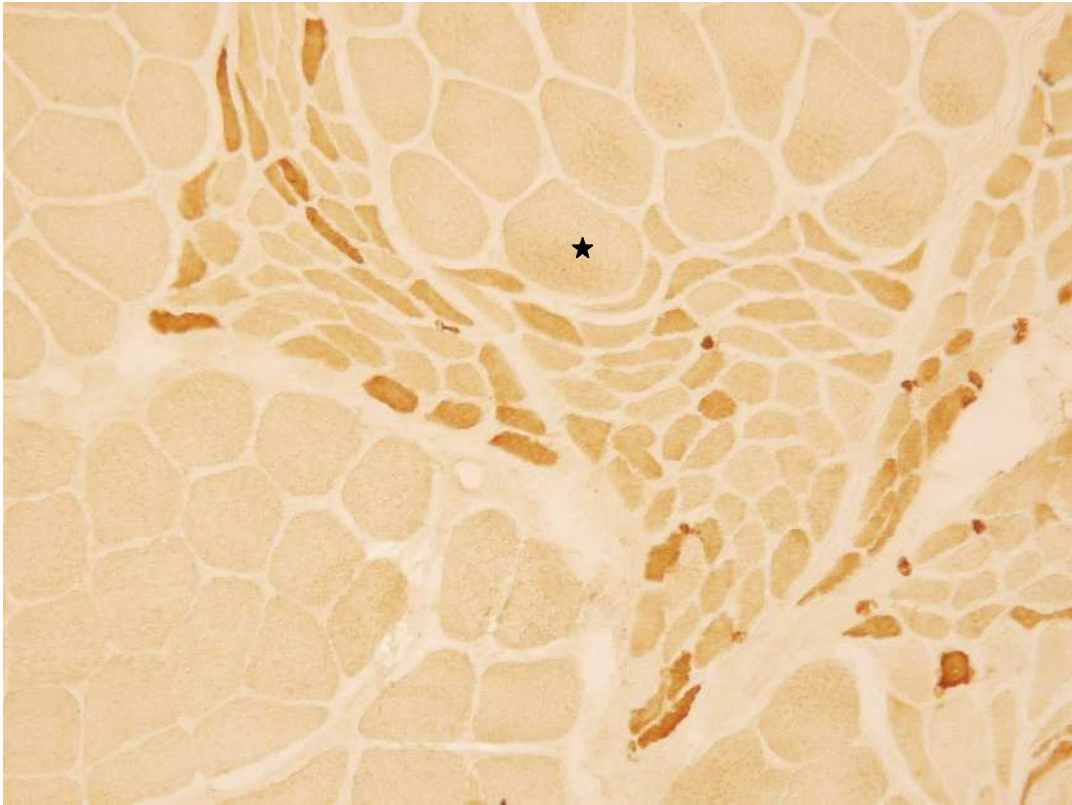
Tabelle 10: Verteilung der für die verschiedenen Marker positiven Fasern auf den Schnitten und Menge der positiven Fasern in Feldern mit kleinen bzw. angulär-atrophen Fasern (in manchen Biopsien kommen Felder mit überwiegend negativen, überwiegend positiven und nur positiven Fasern vor, daher ergeben die Werte dieser Kategorien zusammen mehr als 100%).

	NCAM	MHCn	Myogenin
Gesamtzahl an untersuchten Biopsien	66 Biopsien	65 Biopsien	22 Biopsien (nur Biopsien untersucht, in denen > 10% positive Fasern vorkommen)
Lokale Häufung von positiven Fasern	1 Biopsie (entspricht 1,5%)	3 Biopsien (entspricht 4,6%)	14 Biopsien (entspricht 63,6%)
Positive Fasern gleichmäßig verteilt	65 Biopsien (entspricht 98,5%)	62 Biopsien (entspricht 95,4%)	8 Biopsien (entspricht 36,4%)
Felder mit kleinen Fasern kommen vor	23 Biopsien	23 Biopsien	15 Biopsien
- Fasern in	17 Biopsien	0 Biopsien	8 Biopsien

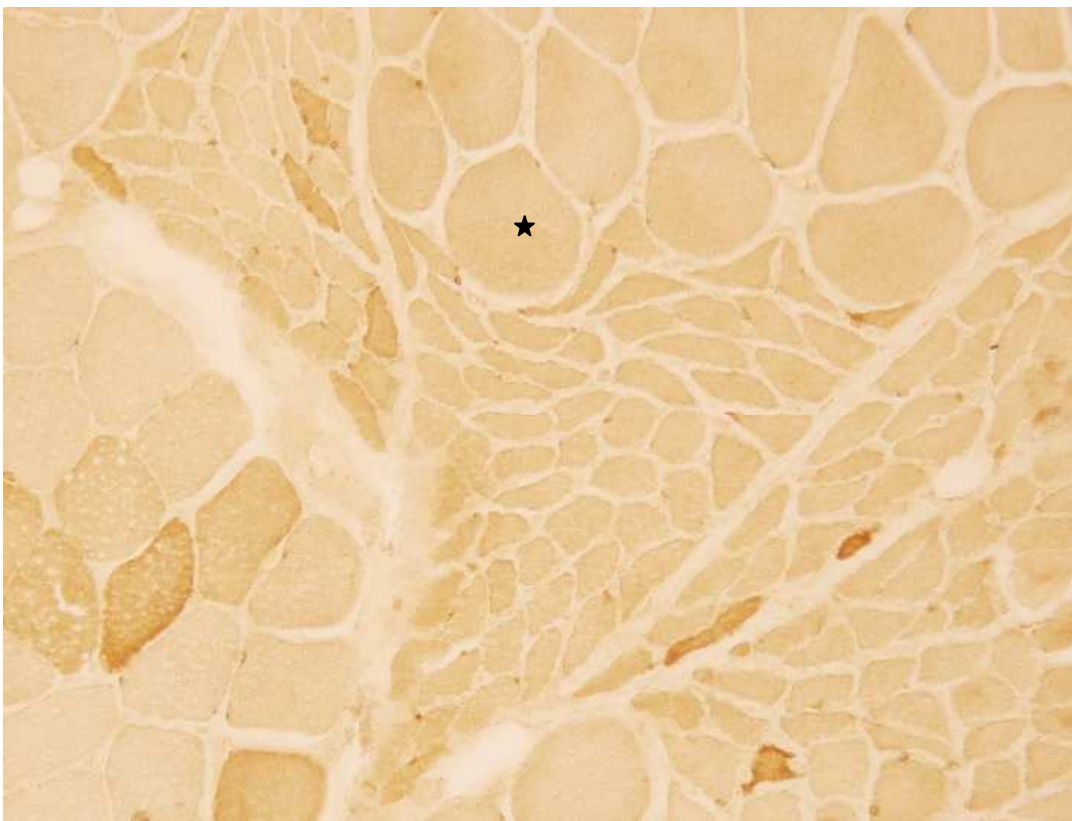
Ergebnisse

Feld überwiegend negativ	(entspricht 73,9% von 23 Biopsien)	(entspricht 0% von 23 Biopsien)	(entspricht 53,3% von 15 Biopsien)
- Fasern in Feld überwiegend positiv	11 Biopsien (entspricht 47,8% von 23 Biopsien)	15 Biopsien (entspricht 65,2% von 23 Biopsien)	10 Biopsien (entspricht 66,7% von 15 Biopsien)
- Alle Fasern in Feld positiv	0 Biopsien (entspricht 0% von 23 Biopsien)	16 Biopsien (entspricht 70,0% von 23 Biopsien)	7 Biopsien (entspricht 46,7% von 15 Biopsien)
Felder mit angulär- atropfen Fasern kommen vor	16 Biopsien	16 Biopsien	9 Biopsien
- Fasern in Feld überwiegend negativ	15 Biopsien (entspricht 93,8% von 16 Biopsien)	6 Biopsien (entspricht 37,5% von 16 Biopsien)	4 Biopsien (entspricht 44,4% von 9 Biopsien)
- Fasern in Feld überwiegend positiv	3 Biopsien (entspricht 18,8% von 16 Biopsien)	12 Biopsien (entspricht 75% von 16 Biopsien)	6 Biopsien (entspricht 66,7% von 9 Biopsien)
- Alle Fasern in Feld positiv	0 Biopsien (entspricht 0% von 16 Biopsien)	5 Biopsien (entspricht 31,3% von 16 Biopsien)	7 Biopsien (entspricht 77,8% von 9 Biopsien)

Ergebnisse



a



b



Abbildung 16: Färbung mit Anti-MHCn (a), Anti-NCAM (b) und Anti-Myogenin (c). Die verschiedenen Färbungen zeigen eine sehr unterschiedliche Verteilung der positiven angulär-atrophen Fasern. Fast alle Fasern sind Myogenin-positiv, jedoch nur wenige sind positiv für MHCn oder NCAM. Der Stern markiert korrespondierende Fasern.

3.4 Kleine Fasern

Neben angulär-atrophen und normal großen Fasern liegen in 50 von 66 untersuchten Biopsien (entspricht 75,8% der Biopsien) im ausgezählten Bereich kleine Fasern vor, die mit einem Durchmesser von weniger als 10 μm deutlich kleiner als die normal großen und angulär-atrophen Fasern sind (Abbildungen 17 bis 21). Von der Form her sind diese Fasern, die im Folgenden als „kleine Fasern“ bezeichnet werden, meist rundlich, ähnlich den normal großen Fasern. In der HE-Färbung konnten den kleinen Fasern Zellkerne zugeordnet werden. Viele kleine Fasern waren mit Anti-NCAM oder Anti-MHCn anfärbbar, was darauf hinweist, dass es sich um Muskelfasern handelt.

Die Menge der kleinen Fasern ist in den einzelnen Biopsien sehr unterschiedlich. Von 200 untersuchten Fasern waren zwischen drei und 146 Fasern kleine Fasern. Im Durchschnitt handelte es sich in den 50 Biopsien, in denen kleine Fasern vorkamen, bei 52,5 von 200 untersuchten Fasern um kleine Fasern. Dies entspricht 26,3%. Die kleinen Fasern verteilten sich unterschiedlich auf den Schnitten: In einigen Biopsien fanden sich Areale, in denen nur kleine Fasern vorlagen (Abbildung 17,19 und 21), in anderen Biopsien lagen die kleinen Fasern gleichmäßig verteilt zwischen den normal großen und angulär-atrophen Fasern (Abbildungen 18 und 20) und in wiederum anderen Biopsien fanden sich Areale mit kleinen Fasern und zusätzlich kleine Fasern, die zwischen den normal großen und angulär-atrophen Fasern verteilt lagen.

3.4.1 Vergleich der durchschnittlichen Menge an positiven kleinen Fasern und der Häufigkeitsverteilung für die verschiedenen Marker (NCAM, MHCn, Myogenin)

3.4.1.1 NCAM

Die Häufigkeit der NCAM-positiven kleinen Fasern ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Anteil NCAM-positiver Fasern von kleinen Fasern insgesamt

NCAM	0% von Fasern positiv	1-33% von Fasern positiv	34-66% von Fasern positiv	67-100% von Fasern positiv	Durchschnittliche Anzahl an positiven kleinen Fasern bezogen auf Gesamtzahl an kleinen Fasern
kleine positive Fasern	1 Biopsie ⇒ 2%	17 Biopsien ⇒ 34%	25 Biopsien ⇒ 50%	7 Biopsien ⇒ 14%	40,8% (95%-KI: 34,7- 47,0%)

Die Menge der NCAM-positiven kleinen Fasern unterscheidet sich von Biopsie zu Biopsie und reicht von 0% bis 84%. Im Durchschnitt sind 40,8% (95%-Konfidenzintervall: 34,7-47,0%) der kleinen Fasern NCAM-positiv, also weniger als die Hälfte. Abbildung 19 zeigt NCAM-positive kleine Fasern.

3.4.1.2 MHCn

Die Häufigkeit der MHCn-positiven kleinen Fasern ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Anteil MHCn-positiver Fasern an kleinen Fasern.

MHCn	0% von Fasern positiv	1-33% von Fasern positiv	34-66% von Fasern positiv	67-100% von Fasern positiv	Durchschnittliche Anzahl an positiven kleinen Fasern
kleine positive Fasern	0 Biopsien ⇒ 0%	0 Biopsien ⇒ 0%	6 Biopsien ⇒ 12%	44 Biopsien ⇒ 88%	82,0% (95%-KI: 78,0- 86,1%)

Die Menge der MHCn-positiven kleinen Fasern liegt in allen Biopsien zwischen 44,4% und 100%. Im Gegensatz zur Menge der NCAM-positiven kleinen Fasern unterscheidet sich die Menge der MHCn-positiven kleinen Fasern von Biopsie zu Biopsie weniger stark. In den meisten Biopsien sind zwischen 67% und 100% der kleinen Fasern MHCn-positiv. Auch sind deutlich mehr kleine Fasern MHCn-positiv als NCAM-positiv: Während im Durchschnitt 40,8% (KI: 34,7-47,0%) der kleinen Fasern NCAM-positiv sind, sind 82,0% (78,0-86,1%) MHCn-positiv. Unter den untersuchten Biopsien ist keine Biopsie, in der die Menge der NCAM-positiven kleinen Fasern die der MHCn-positiven kleinen Fasern übersteigt (Abbildung 17). Nur selten finden sich NCAM-positive kleine Fasern, die für MHCn negativ sind (Abbildung 18).

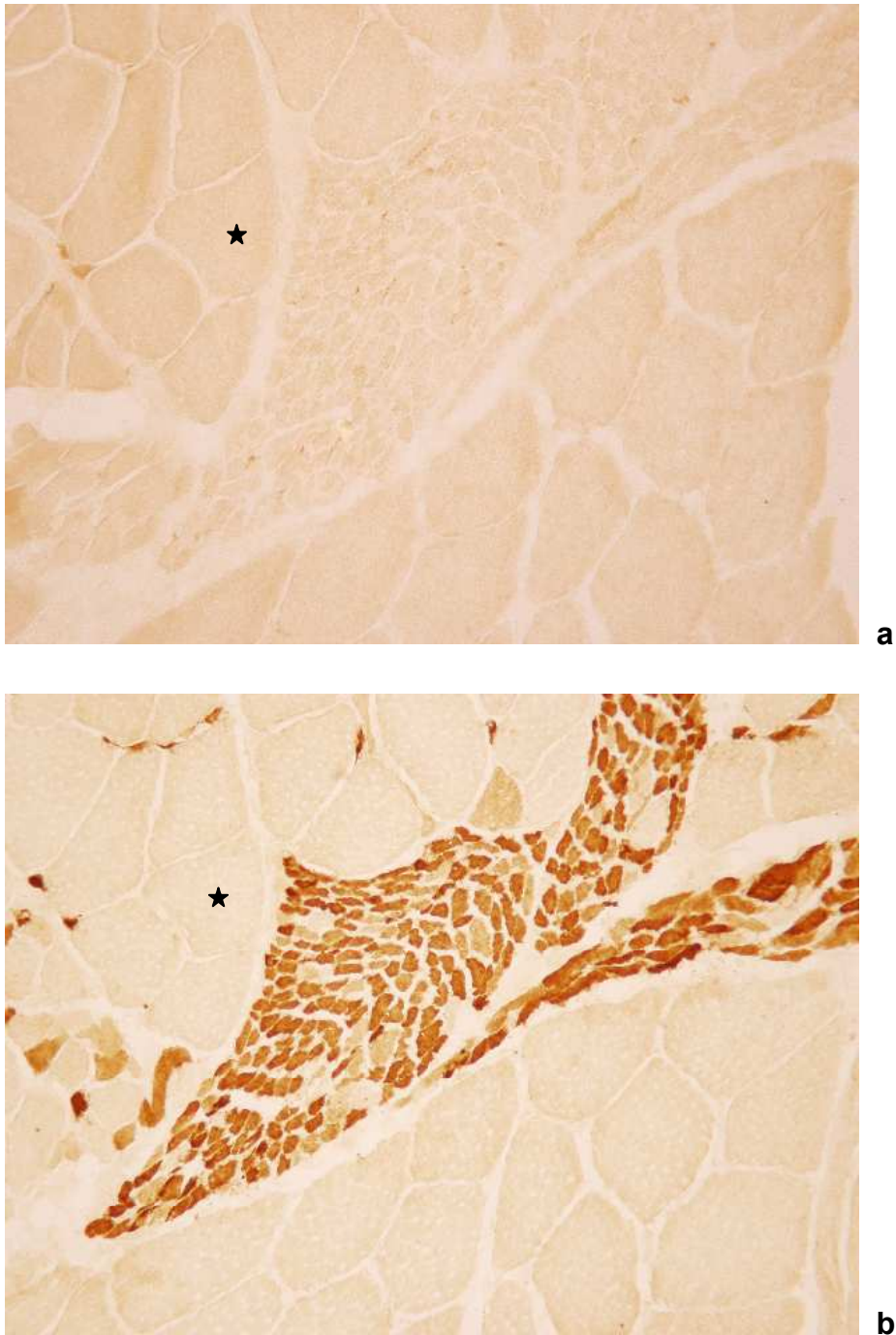


Abbildung 17: Areal von kleinen Fasern zwischen normal großen und angulär-atrophen Fasern. Der Stern markiert korrespondierende Fasern.

a: kleine Fasern in der Färbung mit Anti-NCAM: Alle kleinen Fasern sind negativ.

b: gleiche Stelle in der Färbung mit Anti-MHCn: Die meisten kleinen Fasern sind positiv, auch außerhalb der als Cluster angeordneten kleinen Fasern finden sich einzelne MHCn-positive kleine Fasern.

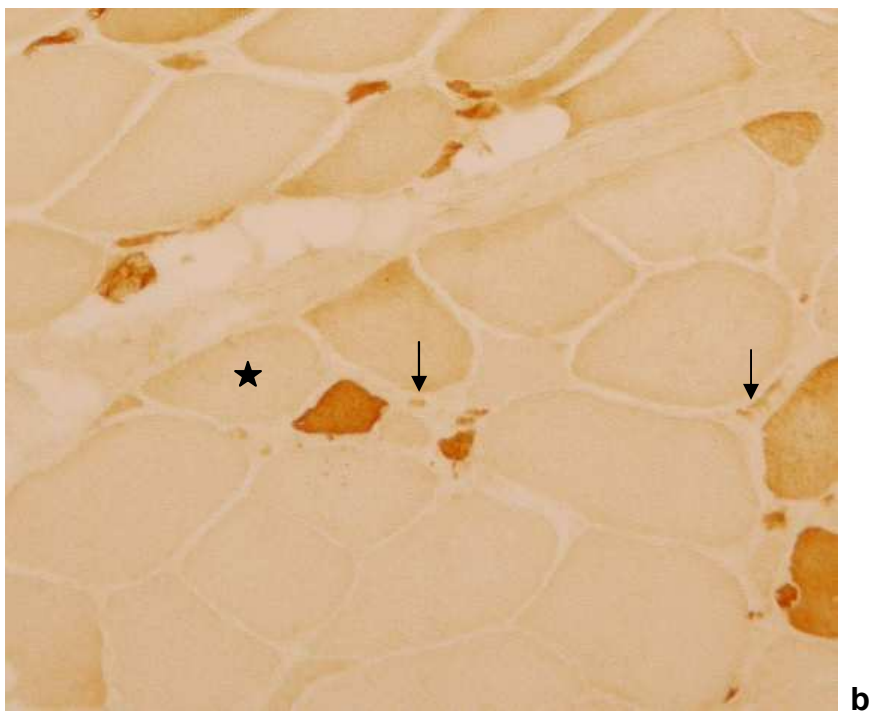
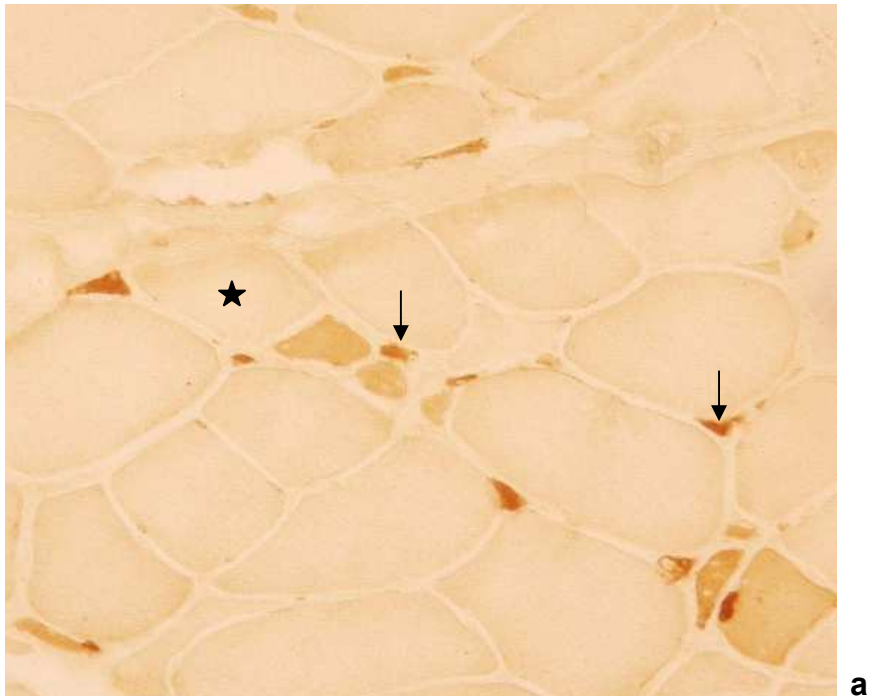


Abbildung 18: Färbungen mit Anti-NCAM (a) und Anti-MHCn (b). Hier zeigt sich der seltene Fall von NCAM-positiven Fasern, die zugleich MHCn-negativ sind (Pfeile). Der Stern dient zur Orientierung und markiert einander entsprechende Fasern.

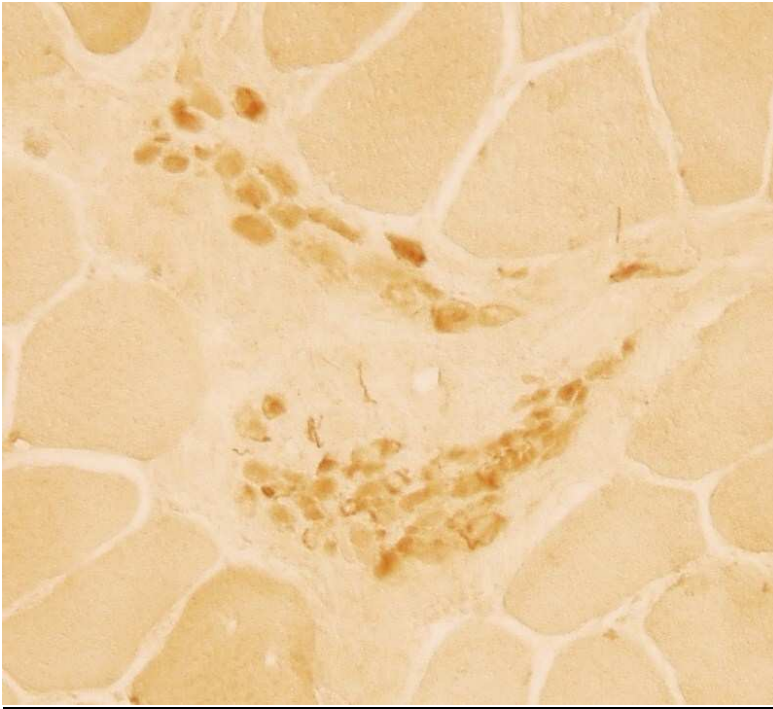


Abbildung 19: Färbung mit Anti-NCAM. Die Abbildung zeigt eine Gruppe von NCAM-positiven kleinen Fasern.

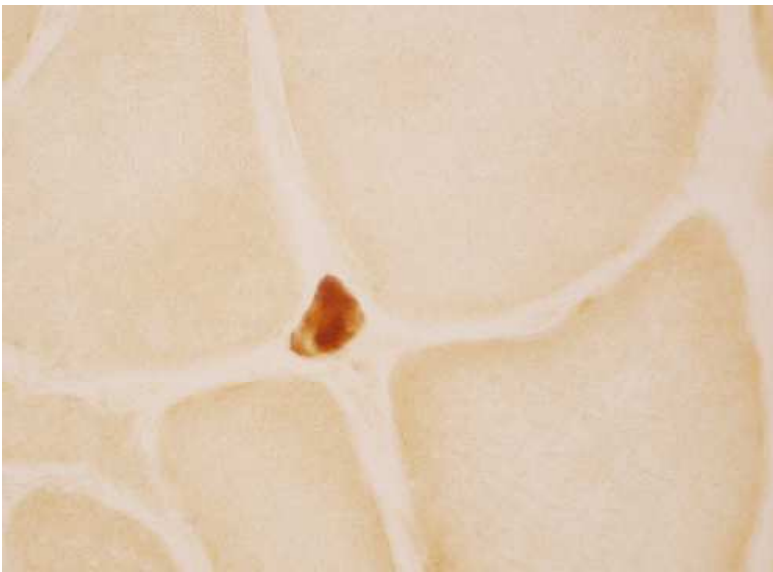


Abbildung 20: Färbung mit Anti-MHCn. Hier sieht man eine kleine Faser, die einzeln zwischen normal großen und angulär-atropen Fasern liegt. Sie ist deutlich MHCn-positiv.

3.4.1.3 Myogenin

Die Häufigkeit der Myogenin-positiven kleinen Fasern ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Anteil Myogenin-positiver Fasern an kleinen Fasern

Myogenin	0% von kleinen Fasern positiv	1-33% von kleinen Fasern positiv	34-66% von kleinen Fasern positiv	67-100% von kleinen Fasern positiv	Mittelwert
positive kleine Fasern	25 Biopsien ⇒ 50%	9 Biopsien ⇒ 18%	12 Biopsien ⇒ 24%	4 Biopsien ⇒ 8%	20,5 % (KI: 12,3-28,6%)

Ebenso wie es viele Biopsien gibt, in denen gar keine Myogenin-positiven angulär-atrophischen Fasern vorkommen, kommen auch in der Hälfte der Biopsien keine Myogenin-positiven kleinen Fasern vor. Im Vergleich zur Menge der NCAM- bzw. MHCn-positiven kleinen Fasern sind für Myogenin deutlich weniger kleine Fasern positiv. Betrachtet man jedoch nur die Biopsien, in denen Myogenin-positiv kleine Fasern vorkommen (Abbildung 21), so ähnelt die Verteilung der Biopsien auf die Prozentbereiche der Verteilung der NCAM-positiven kleinen Fasern. Ebenso wie bei NCAM liegt der Schwerpunkt zwischen 34% und 66% an positiven kleinen Fasern.

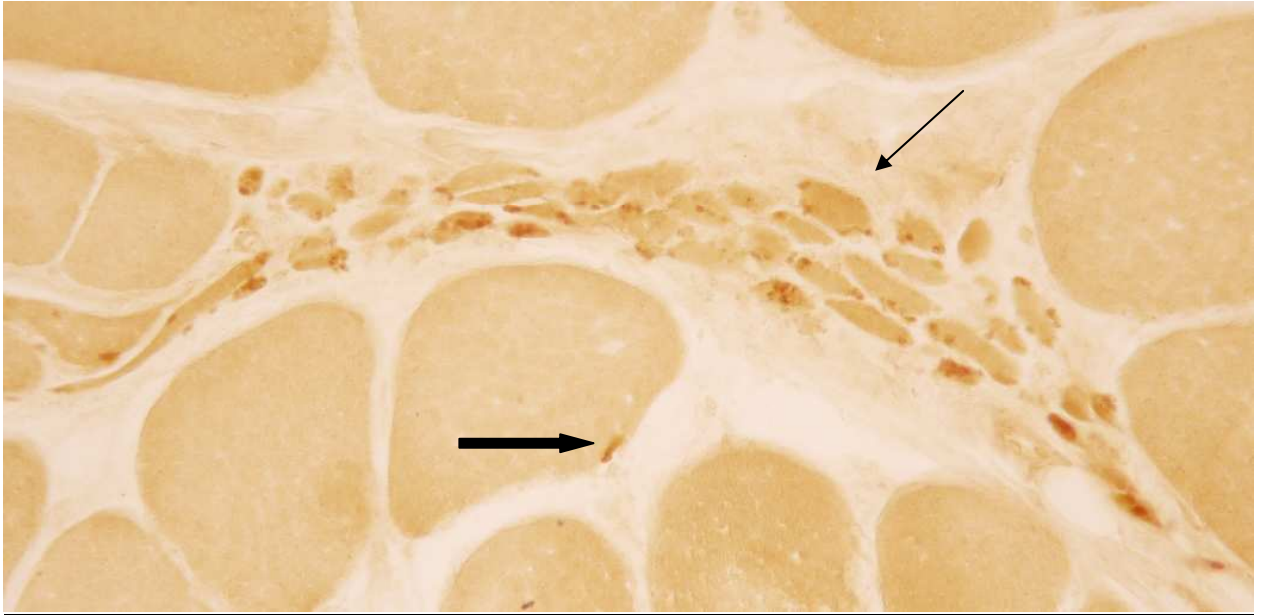


Abbildung 21: Färbung mit Anti-Myogenin: Feld mit kleinen Myogenin-positiven Fasern (dünner Pfeil). Auch eine normal große Faser zeigt einen Myogenin-positiven Zellkern (dicker Pfeil).

3.4.2 Vergleich der Menge an positiven kleinen Fasern in den einzelnen Biopsien für die verschiedenen Marker (NCAM, MHCn, Myogenin)

Bei Betrachtung der durchschnittlichen Werte an positiven kleinen Fasern für die verschiedenen Marker fällt deutlich auf, dass der Mittelwert an MHCn-positiven kleinen Fasern signifikant über dem der NCAM- und Myogenin-positiven kleinen Fasern liegt ($p < 0,0001$). Dass die Menge der MHCn-positiven kleinen Fasern über der der NCAM- und Myogenin-positiven liegt, wird auch bei der Betrachtung der einzelnen Biopsien deutlich (Abbildung 17).

Diagramm 7 zeigt die Menge der NCAM-, MHCn- und Myogenin-positiven kleinen Marker für jede Biopsie einzeln auf, geordnet nach aufsteigender Menge der MHCn-positiven kleinen Fasern. Man kann deutlich erkennen, dass die Menge der NCAM-positiven kleinen Fasern immer unterhalb der Menge der MHCn-positiven Fasern liegt. Auch die Menge der Myogenin-positiven kleinen Fasern liegt fast immer unter der Menge der MHCn-positiven kleinen Fasern, lediglich in zwei Biopsien liegt sie oberhalb der Menge für MHCn.

In Diagramm 8 sind die Biopsien nach zunehmender Menge an NCAM-positiven kleinen Fasern geordnet. Wie schon in Diagramm 7 deutlich wird, ist die Menge der MHCn-positiven kleinen Fasern in allen Biopsien höher als die Menge der NCAM-positiven kleinen Fasern. Demzufolge liegen die Werte für die MHCn-positiven kleinen Fasern in Diagramm 8 alle über den Werten für die NCAM-positiven kleinen Fasern. Im Vergleich der Menge der NCAM-positiven kleinen Fasern mit der Menge der Myogenin-positiven kleinen Fasern lässt sich keine Gesetzmäßigkeit feststellen. Man kann zwar sehen, dass in vielen Biopsien keine Myogenin-positiven kleinen Fasern vorkommen, was für NCAM selten der Fall ist, in den Biopsien, in denen jedoch Myogenin-positiv kleine Fasern vorliegen, sind deren Werte gleichmäßig über das Diagramm verteilt und liegen teilweise über und teilweise unter denen für NCAM.

In Diagramm 9 sind die Werte der einzelnen Marker aufsteigend nach denen von Myogenin geordnet. Man sieht hier deutlich, dass in über der Hälfte der Biopsien keine Myogenin-positiven kleinen Fasern vorliegen. Zur Menge der MHCn- und NCAM-positiven kleinen Fasern ist keine direkte Assoziation zu erkennen, außer dass die Menge der MHCn-positiven kleinen Fasern bis auf zwei Ausnahmen immer über der der Myogenin-positiven kleinen Fasern liegt.

Diagramm 10 zeigt die durchschnittlichen Werte der für die einzelnen Marker positiven kleinen Fasern: Die Menge der MHCn-, der NCAM- und der Myogenin-positiven kleinen Fasern unterscheidet sich dabei signifikant (NCAM und Myogenin: $p=0,0002$; MHCn und Myogenin: $p<0,0001$; MHCn und NCAM: $p<0,0001$) voneinander. Es sind signifikant mehr kleine Fasern MHCn-positiv als NCAM- oder Myogenin-positiv.

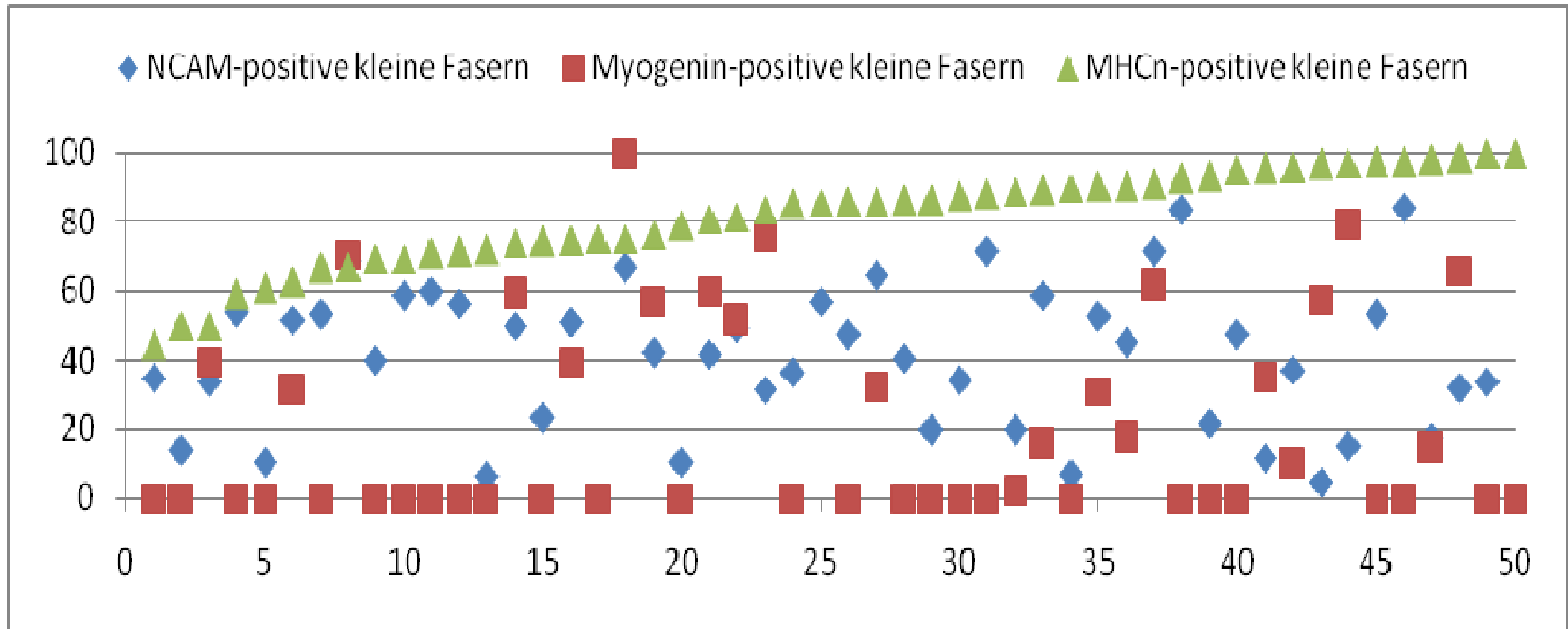


Diagramm 7: Verteilung der Prozentwerte der für einen bestimmten Marker positiven kleinen Fasern (y-Achse) in den einzelnen Biopsien (x-Achse: einzelne Biopsien, angeordnet nach Menge der MHCn-positiven kleinen Fasern in aufsteigender Reihenfolge); rotes Quadrat: Myogenin; blaue Raute: NCAM; grünes Dreieck: MHCn: Die Menge der MHCn-positiven kleinen Fasern liegt in allen Biopsien über der Menge der NCAM-positiven kleinen Fasern und bis auf zwei Ausnahmen auch immer über der Menge der Myogenin-positiven kleinen Fasern.

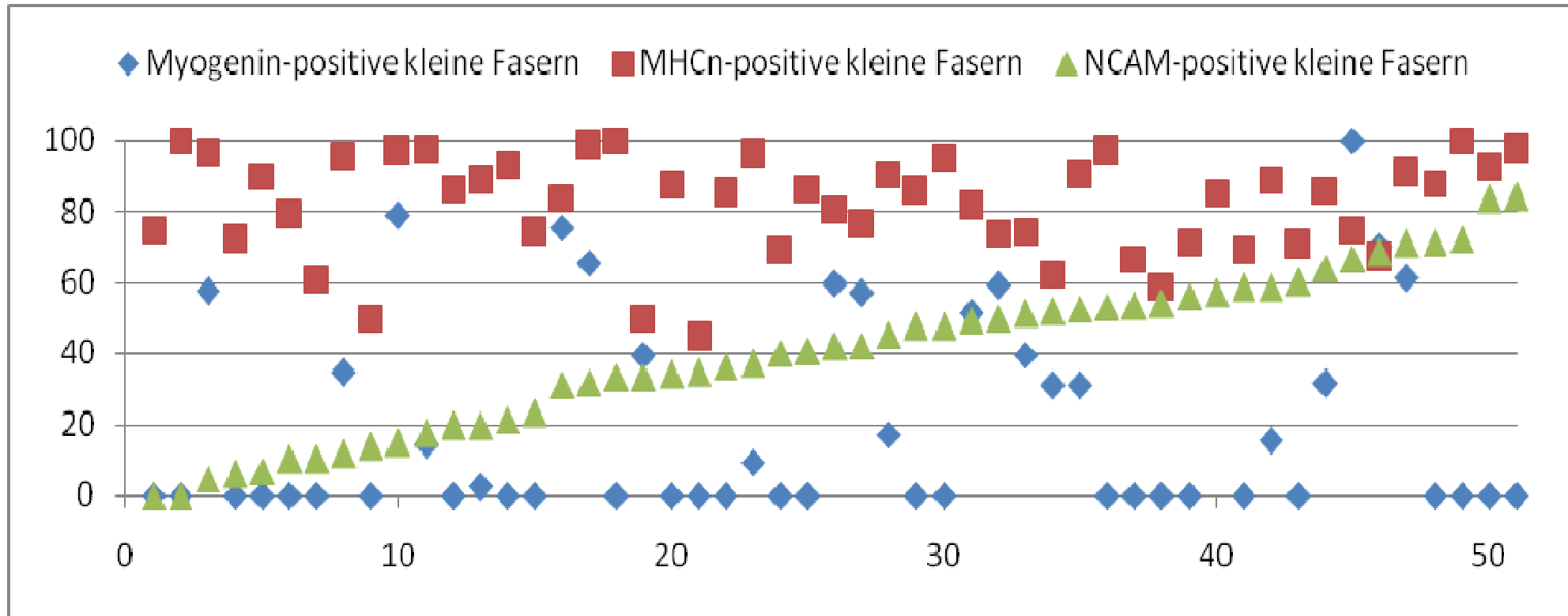


Diagramm 8: Verteilung der Prozentwerte der für einen bestimmten Marker positiven kleinen Fasern (y-Achse) in den einzelnen Biopsien (x-Achse: einzelne Biopsien, angeordnet nach Menge der NCAM-positiven kleinen Fasern in aufsteigender Reihenfolge); rotes Quadrat: MHCn; blaue Raute: Myogenin; grünes Dreieck: NCAM: Die Menge der MHCn-positiven kleinen Fasern liegt in allen Biopsien über der Menge der NCAM-positiven kleinen Fasern.

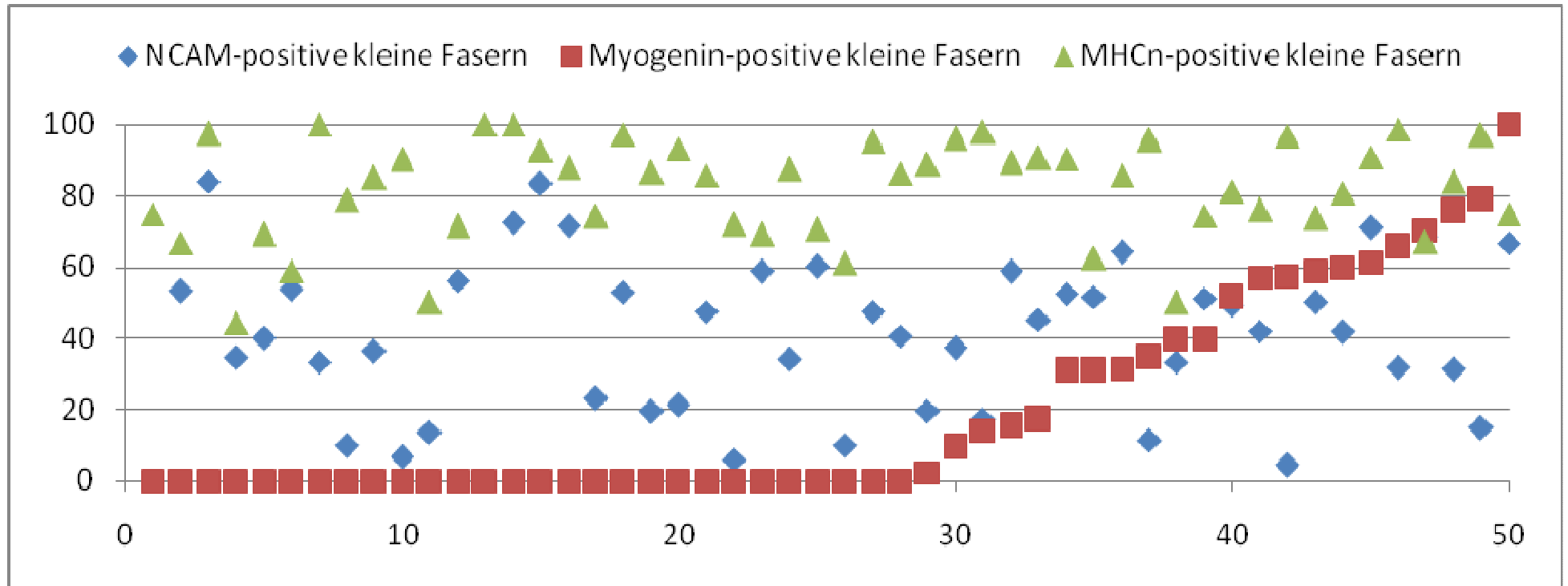


Diagramm 9: Verteilung der Prozentwerte der für einen bestimmten Marker positiven kleinen Fasern (y-Achse) in den einzelnen Biopsien (x-Achse: einzelne Biopsien, angeordnet in nach Menge der Myogenin-positiven kleinen Fasern in aufsteigender Reihenfolge); rotes Quadrat: Myogenin; blaue Raute: NCAM; grünes Dreieck: MHCn: Es finden sich häufiger Biopsien, in denen keine Myogenin-positiven kleinen Fasern vorkommen, als Biopsien, in denen keine NCAM- oder MHCn-positiven kleinen Fasern vorkommen. Die Menge der MHCn-positiven kleinen Fasern liegt bis auf zwei Ausnahmen immer über der Menge der Myogenin-positiven kleinen Fasern.

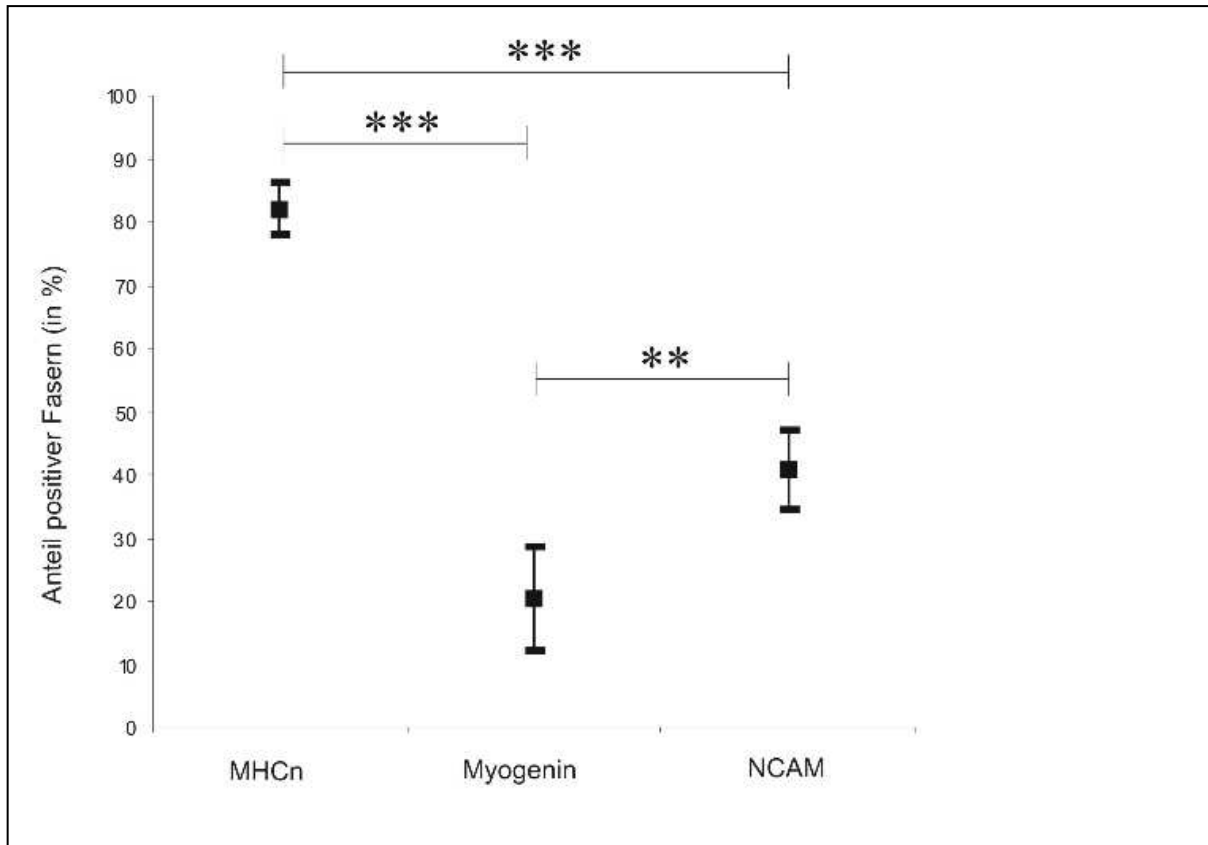


Diagramm 10: Menge der für die einzelnen Marker durchschnittlich positiven kleinen Fasern in Prozent mit 95%-Konfidenzintervall. Die einzelnen Marker unterscheiden sich signifikant in der Menge der positiven kleinen Fasern. Die Analyse erfolgte mit gepaartem t-Test (** $0,0001 < p < 0,01$; *** $p < 0,0001$).

3.4.3 Vergleich der Menge der für die einzelnen Marker positiven kleinen Fasern in Biopsien mit verschiedener Menge an kleinen Fasern

Durchschnittlich handelt es sich in einer Biopsie bei 52,5 von 200 untersuchten Fasern um kleine Fasern. Untersucht man die Menge der Myogenin-positiven kleinen Fasern in Biopsie mit mehr als 52,5 kleinen Fasern von 200 untersuchten Fasern, so fällt auf, dass Myogenin in diesen Biopsien häufiger positiv ist, als in Biopsien mit weniger als 52,5 kleinen Fasern von 200 untersuchten Fasern. In Biopsien mit vielen kleinen Fasern ist Myogenin also häufiger positiv (Tabelle 14).

Tabelle 14: Verteilung der Häufigkeit der Myogenin-positiven und der Myogenin-negativen auf Biopsien mit vielen und auf Biopsien mit wenigen kleinen Fasern.

	Biopsien mit überdurchschnittlich vielen kleinen Fasern (19 Biopsien, entspricht 100%)	Biopsien mit überdurchschnittlich wenigen kleinen Fasern (31 Biopsien, entspricht 100%)	Alle Biopsien zusammen (50 Biopsien, entspricht 100%)
Keine Myogenin-positiven kleinen Fasern vorhanden	5 Biopsien (26,3%)	22 Biopsien (71,0%)	27 Biopsien (54%)
Myogenin-positive kleine Fasern vorhanden	14 Biopsien (73,7%)	9 Biopsien (29,0%)	23 Biopsien (46%)

Untersucht sucht man die Biopsien getrennt nach ihrer Menge an kleinen Fasern auf ihre Menge an NCAM-positiven kleinen Fasern, so fällt auf, dass Biopsien mit vielen kleinen Fasern einen größeren Anteil an NCAM-positiven kleinen Fasern aufweisen, als Biopsien, in denen wenig kleine Fasern vorkommen. Der Unterschied ist allerdings weniger stark ausgeprägt als bei Myogenin (Tabelle 15).

Tabelle 15: Überdurchschnittlich viele bzw. wenige NCAM-positive kleine Fasern in Biopsien mit vielen bzw. wenigen kleinen Fasern.

	Biopsien mit überdurchschnittlich vielen kleinen Fasern (19 Biopsien, entspricht 100%)	Biopsien mit überdurchschnittlich wenigen kleinen Fasern (31 Biopsien, entspricht 100%)	Alle Biopsien zusammen (50 Biopsien, entspricht 100%)
Überdurchschnittlich viele NCAM-positive kleine Fasern (>40,8%)	13 Biopsien (68,4%)	13 Biopsien (41,9%)	26 Biopsien (52%)
Überdurchschnittlich wenige NCAM-positive kleine Fasern (<40,8%)	6 Biopsien (31,6%)	18 Biopsien (58,1%)	24 Biopsien (48%)

Auch MHCn-positive kleine Fasern finden sich in einem höheren Prozentsatz in Biopsien mit vielen kleinen Fasern, während Biopsien mit wenigen kleinen Fasern einen geringeren Anteil an MHCn-positiven kleinen Fasern aufweisen. Der Unterschied ist hier aber geringer ausgeprägt als bei NCAM und Myogenin (Tabelle 16).

Tabelle 16: Überdurchschnittlich viele bzw. wenige MHCn-positive kleine Fasern in Biopsien mit vielen bzw. wenigen kleinen Fasern.

	Biopsien mit überdurchschnittlich vielen kleinen Fasern (19 Biopsien, entspricht 100%)	Biopsien mit überdurchschnittlich wenigen kleinen Fasern (31 Biopsien, entspricht 100%)	Alle Biopsien zusammen (50 Biopsien, entspricht 100%)
Überdurchschnittlich viele MHCn-positive kleine Fasern (>82,0%)	13 Biopsien (68,4%)	15 Biopsien (48,4%)	28 Biopsien (56%)
Überdurchschnittlich wenige MHCn-positive kleine Fasern (<82,0%)	6 Biopsien (31,6%)	16 Biopsien (51,6%)	22 Biopsien (44%)

3.5 Normal große Fasern

In allen Biopsien mit neurogener Atrophie finden sich neben angulär-atrophen und kleinen Fasern auch Fasern von normaler Größe und Form. Einige dieser normal großen Fasern sind NCAM-positiv (Abbildung 13), was für Denervation spricht. Andere sind NCAM-negativ, wobei man hierbei nicht sicher sagen kann, ob diese reinnerviert sind oder gar nie denerviert waren. Man kann bei normal großen NCAM-negativen Fasern somit nicht ohne weiteres auf den Innervationszustand schließen.

3.5.1 Vergleich der durchschnittlichen Menge an positiven normal großen Fasern und der Häufigkeitsverteilung für die verschiedenen Marker (NCAM, MHCn, Myogenin)

3.5.1.1 NCAM

Die Häufigkeit der NCAM-positiven normal-großen Fasern ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Anteil NCAM-positiver Fasern an normal großen Fasern insgesamt

	0%	1-33%	34-66%	67-100%	Durchschnittlicher Wert an NCAM-positiven normal großen Fasern bezogen auf Gesamtmenge der normal großen Fasern
NCAM-positive normal große Fasern	10 Biopsien ⇒ 15,2%	51 Biopsien ⇒ 77,3%	5 Biopsien ⇒ 7,6%	0 Biopsien ⇒ 0%	10,7%

Die Menge der NCAM-positiven normal großen Fasern liegt in allen Biopsien zwischen 0 und 48,7%. In 38 Biopsien (entspricht 57,6%) sind weniger als 10% der normal großen Fasern NCAM-positiv.

3.2.1.2 MHCn

Die Häufigkeit der MHCn-positiven normal großen Fasern ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Anteil MHCn-positiver Fasern an normal großen Fasern insgesamt

	0%	1-33%	34-66%	67-100%	Durchschnittlicher Wert an MHCn-positiven normal großen Fasern bezogen auf Gesamtmenge der normal großen Fasern
MHCn- positive normal große Fasern	19 Biopsien => 29,2%	44 Biopsien ⇒ 67,7%	2 Biopsien ⇒ 3,1%	0 Biopsien ⇒ 0%	4,9%

Die Menge der MHCn-positiven normal großen Fasern liegt in allen Biopsien zwischen 0 und 40,4%. In 58 Biopsien (entspricht 89,2%) sind weniger als 10% der normal großen Fasern MHCn-positiv. Im Vergleich zur Menge der NCAM-positiven normal großen Fasern ist die Menge der MHCn-positiven normal großen Fasern deutlich geringer. Es finden sich häufiger Biopsien, in denen weniger MHCn-positiven normal große Fasern vorkommen, als dies für NCAM der Fall ist (Abbildung 13).

3.2.1.3 Myogenin

Die Häufigkeit der Myogenin-positiven normal großen Fasern ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Anteil Myogenin-positiver Fasern an normal großen Fasern insgesamt

	0%	1-33%	34-66%	67-100%	Durchschnittlicher Wert an Myogenin-positiven normal großen Fasern bezogen auf Gesamtmenge der normal großen Fasern
Myogenin- positive normal große Fasern	48 Biopsien => 75%	16 Biopsien ⇒ 25%	0 Biopsien ⇒ 0%	0 Biopsien ⇒ 0%	1,8%

Die Menge der Myogenin-positiven normal großen Fasern liegt in allen Biopsien zwischen 0 und 23,5%. In 59 Biopsien (entspricht 92,2%) sind weniger als 10% der normal großen Fasern Myogenin-positiv. Vergleicht man diese Werte mit denen von NCAM und MHCn, so sieht man, das im Durchschnitt deutlich weniger Myogenin-positiven normal großen Fasern vorkommen als dies für NCAM und MHCn der Fall ist. Außerdem kommen in 75% aller Biopsien gar keine Myogenin-positiven normal großen Fasern, während dies bei MHCn in nur 29,2% der Biopsien und bei NCAM nur in 15,2% der Biopsien der Fall ist. Abbildung 21 zeigt neben kleinen Myogenin-positiven Fasern auch eine normal große Myogenin-positive Faser.

Bei NCAM und MHCn sind in den meisten Biopsien zwischen 1 und 33% der normal großen Fasern positiv. Bei Myogenin weisen die meisten Biopsien keine positiven normal großen Fasern auf. Es fällt außerdem auf, dass bei NCAM mehr Biopsien zwischen 34 und 66% an positiven normal großen Fasern aufweisen als bei den beiden anderen Markern (NCAM: 7,6%; MHCn: 3,1%; Myogenin: 0%).

Betrachtet man die Anzahl der Biopsien, in denen weniger als 10% der normal großen Fasern positiv sind, so sind dies bei NCAM 38 Biopsien (entspricht 57,6%), während für MHCn 58 Biopsien (entspricht 89,2%) und für Myogenin 59 Biopsien (entspricht 92,2%) in diese Kategorie fallen.

3.5.2 Vergleich der Menge an positiven normal großen Fasern in den einzelnen Biopsien für die verschiedenen Marker (NCAM, MHCn, Myogenin)

Vergleicht man die durchschnittliche Menge der positiven normal großen Fasern bei den unterschiedlichen Markern, so fällt auf, dass der durchschnittliche Wert an positiven normal großen Fasern bezogen auf die Gesamtheit der normal großen Fasern bei NCAM am größten ist (Tabellen 17 bis 19, Abbildung 13).

Vergleicht man statt den Mittelwerten die Werte in den einzelnen Biopsien, so fallen weitere Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den drei Markern auf:

Diagramm 11 zeigt die Werte der einzelnen Marker in den verschiedenen Biopsien geordnet nach aufsteigender Menge an NCAM-positiven normal großen Fasern. Hier fällt auf, dass die Menge der Myogenin-positiven normal großen Fasern fast immer unter der Menge der NCAM-positiven normal großen Fasern liegt. Die Werte für MHCn liegen meist unter 10%, in Biopsien mit mehr NCAM-positiven normal großen Fasern sind sie eher höher als in Biopsien mit wenig NCAM-positiven normal großen Fasern.

In Diagramm 12 sind die Werte nach aufsteigender Menge an Myogenin-positiven normal großen Fasern angeordnet. Die Menge der Myogenin-positiven normal großen Fasern ist in allen Biopsien eher gering, die Menge der NCAM- und MHCn-positiven normal großen Fasern liegt fast immer über der Menge der Myogenin-positiven normal großen Fasern. In den wenigen Biopsien, in denen Myogenin-positiven normal große Fasern vorkommen, liegen die Werte für die MHCn-positiven normal großen Fasern höher als in

Biopsien, in denen keine Myogenin-positiven normal großen Fasern vorkommen.

In Diagramm 13 sind die Werte nach aufsteigender Menge an MHCn-positiven normal großen Fasern geordnet. Hier fällt auf, dass die Menge der NCAM-positiven normal großen Fasern überwiegend über der Menge der MHCn-positiven normal großen Fasern liegt. In einigen Fällen liegt diese sogar weit darüber, während die Werte der NCAM-positiven normal großen Faser in den Fällen, in denen sie geringer als die der MHCn-positiven normal großen Fasern sind, nur leicht unter diesen liegen. Die meisten Biopsien mit hohen Werten an MHCn-positiven normal großen Fasern weisen auch hohe Werte an NCAM-positiven normal großen Fasern auf, während dies umgekehrt nicht so häufig der Fall ist (Diagramm 11). Desweiteren kann man sehen, dass die meisten Biopsien weniger als 10% an MHCn-positiven normal großen Fasern aufweisen. Nur vereinzelte Biopsien weisen mehr auf, diese liegen dafür aber in größerem Abstand über den 10%. Man kann dies daran erkennen, dass die Kurve der MHCn-positiven normal großen Fasern auf der Höhe von 10% einen Knick nach oben beschreibt.

Vergleicht man in allen Diagrammen die Kurven der Marker, nach denen die Biopsien auf der x-Achse angeordnet sind, so fällt auf, dass die Kurve für NCAM deutlich früher ansteigt als die Kurven für die beiden anderen Marker. Dies liegt daran, dass häufiger höhere Werte an NCAM-positiven normal großen Fasern vorkommen, als dies für die anderen Marker der Fall ist.

Für Myogenin weist die Kurve nur in wenigen Fällen hohe Werte auf, was darauf hindeutet, dass in vielen Biopsien keine oder kaum Myogenin-positiv normal große Fasern vorkommen. Die Kurve für MHCn zeigt kaum häufiger als die nach NCAM geordnete Kurve 0% an. Allerdings sind die einzelnen Prozentwerte oft im Vergleich zu NCAM sehr gering, da es sehr viele Biopsien gibt, in denen zwar MHCn-positiv normal große Fasern vorkommen, jedoch nur in geringer Anzahl. Am Ende steigt die Kurve für MHCn steiler an als dies bei NCAM und Myogenin der Fall ist. Dies liegt daran, dass es nur wenige Biopsien gibt, in denen viele MHCn-positiven normal großen Fasern

Ergebnisse

vorkommen, in diesen wenigen ist die Zahl der MHCn-positiven normal großen Fasern jedoch weit überdurchschnittlich. Die Kurven für NCAM und Myogenin steigen nicht so steil an, da es ein kontinuierliches Spektrum an Biopsien mit den ansteigend überdurchschnittlichen Mengen an positiven normal großen Fasern gibt.

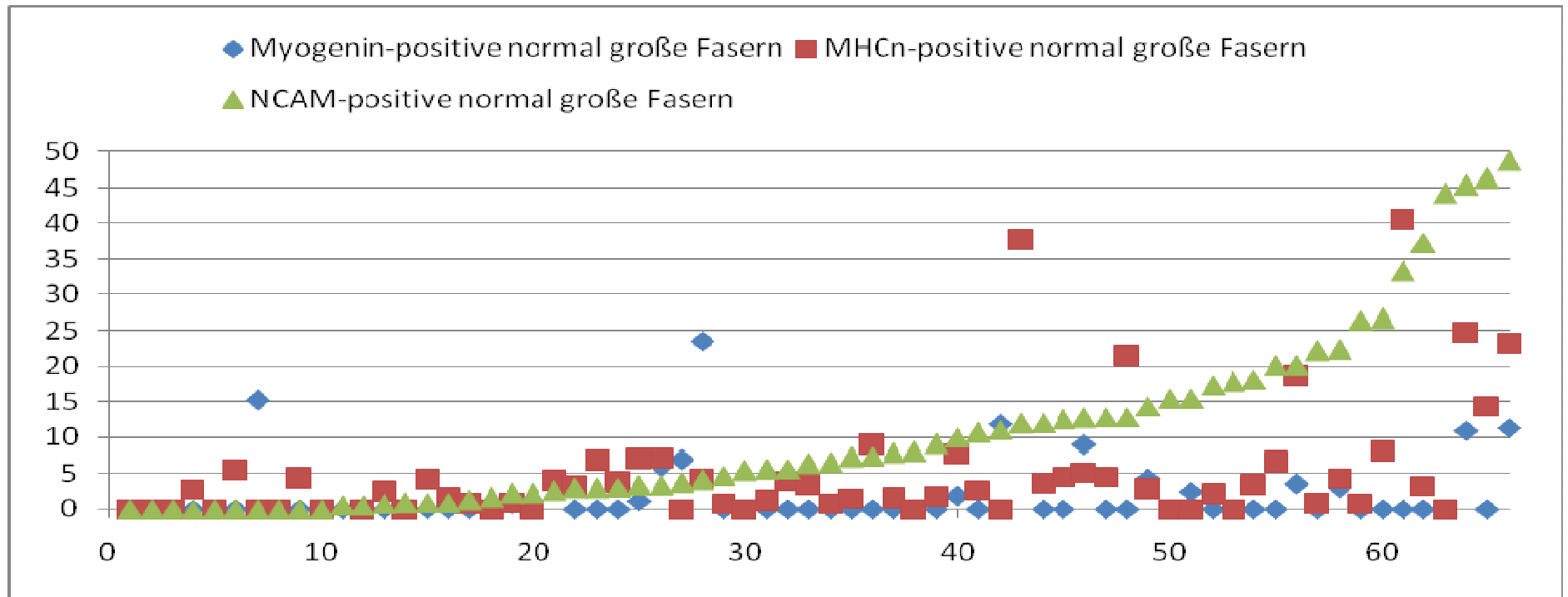


Diagramm 11: Verteilung der Prozentwerte der für einen bestimmten Marker positiven normal großen Fasern (y-Achse) in den einzelnen Biopsien (x-Achse: einzelne Biopsien, angeordnet nach Menge der NCAM-positiven normal großen Fasern in aufsteigender Reihenfolge): Die Menge der Myogenin- und der MHCn-positiven normal großen Fasern liegt meist unter der Menge der NCAM-positiven normal großen Fasern. Die Menge der MHCn-positiven normal großen Fasern liegt in Biopsien mit vielen NCAM-positiven normal großen Fasern eher höher als in Biopsien mit wenigen NCAM-positiven normal großen Fasern.

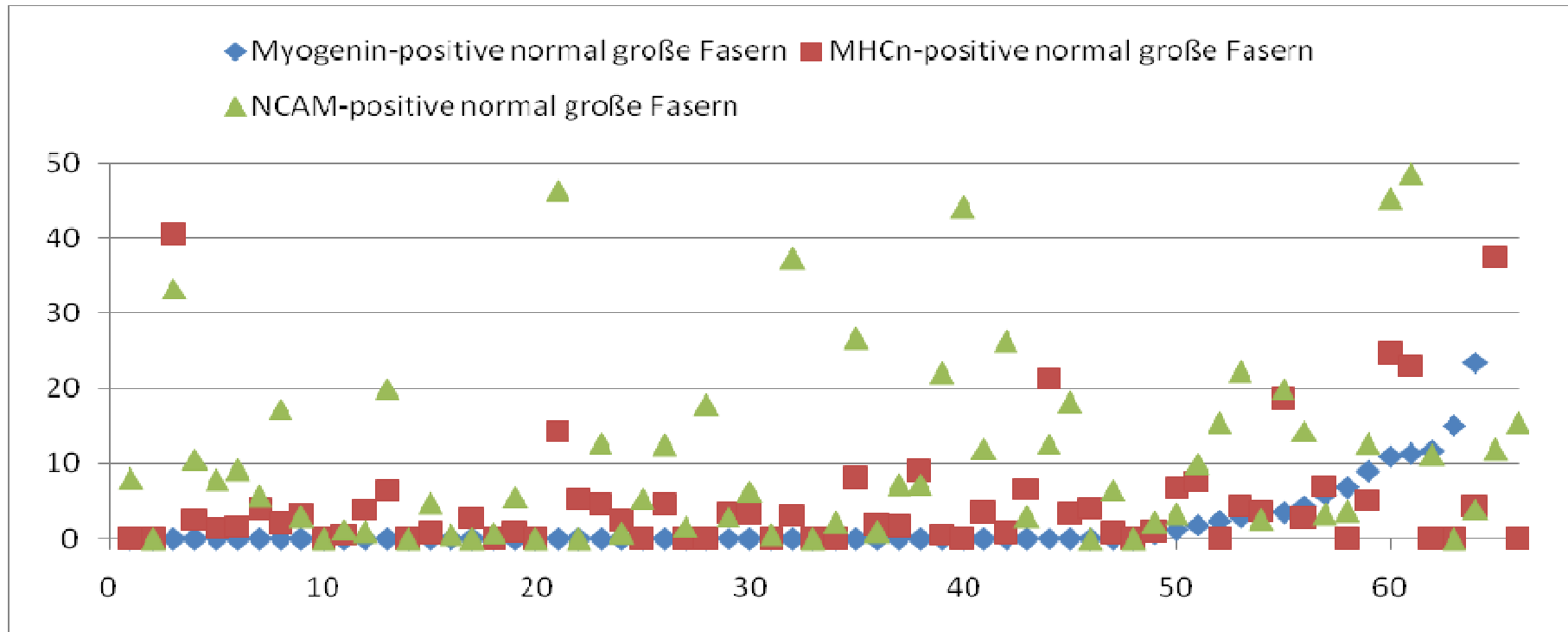


Diagramm 12: Verteilung der Prozentwerte der für einen bestimmten Marker positiven normal großen Fasern (y-Achse) in den einzelnen Biopsien (x-Achse: einzelne Biopsien, angeordnet in nach Menge der Myogenin-positiven normal großen Fasern in aufsteigender Reihenfolge): Die Menge der Myogenin-positiven normal großen Fasern ist gering, die Werte für NCAM und MHCn liegen meist darüber. In den Biopsien, in denen Myogenin-positive normal große Fasern vorkommen, ist die Menge der MHCn-positiven normal großen Fasern höher als in Biopsien, in denen keine Myogenin-positiven normal großen Fasern vorkommen.

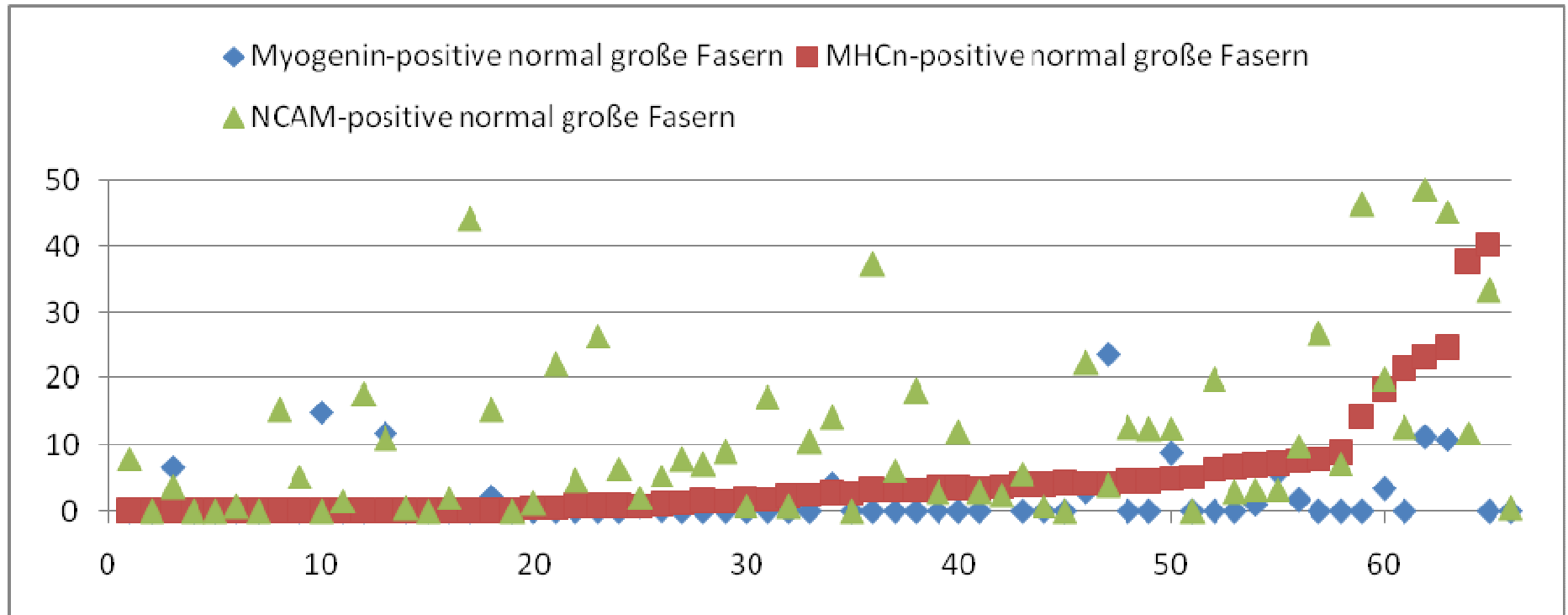


Diagramm 13: Verteilung der Prozentwerte der für einen bestimmten Marker positiven normal großen Fasern (y-Achse) in den einzelnen Biopsien (x-Achse: einzelne Biopsien, angeordnet in nach Menge der MHCn-positiven normal großen Fasern in aufsteigender Reihenfolge): NCAM: Die Menge der NCAM-positiven normal großen Fasern liegt meist über der Menge der MHCn-positiven normal großen Fasern. Die meisten Biopsien weisen weniger als 10% MHCn-positiv normal große Fasern auf. Die meisten Biopsien mit hohen Werten für MHCn weisen auch hohe Werte für NCAM auf.

3.5.3 Vergleich der Biopsien nach der Menge ihrer NCAM- und MHCn-positiven normal großen Fasern

Die untersuchten Biopsien unterscheiden sich in ihrer Menge an NCAM- und MHCn-positiven normal großen Fasern. Es gibt Biopsien mit wenigen NCAM-positiven und wenigen MHCn-positiven normal großen Fasern, Biopsien mit vielen NCAM-positiven und vielen MHCn-positiven normal großen Fasern, Biopsien mit wenigen NCAM-positiven und vielen MHCn-positiven normal großen Fasern und Biopsien mit vielen NCAM-positiven und wenigen MHCn-positiven normal großen Fasern. Untersucht man diese vier Gruppen getrennt nach der Menge der NCAM-negativen angulär-atrophen Fasern, der Einordnung in die Kategorien „chronisch“ und „akut“ und dem Vorhandensein von Myogenin-positiven Fasern, so fallen Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

In Tabelle 20 sind die verschiedenen Werte für die einzelnen Gruppen dargestellt. Viel NCAM bedeutet mehr als der durchschnittliche Werte an NCAM-positiven normal großen Fasern, also mehr als 10,7%. Wenig NCAM entspricht weniger als 10,7% an positiven normal großen Fasern. Für MHCn gilt das gleiche Prinzip, der Durchschnittswert beträgt hier 4,9%. Das Vorhandensein von Myogenin ist zum einen bezogen auf alle Fasern und zum anderen bezogen auf normal große Fasern untersucht worden. Desweiteren wurde die Menge der NCAM-negativen angulär-atrophen Fasern als Zeichen für Reinnervation betrachtet. Viele NCAM-negative angulär-atrophe Fasern bedeutet mehr als der durchschnittliche Wert (33%), wenig NCAM-negative angulär-atrophe Fasern weniger als der durchschnittliche Wert. Zum Vergleich sind in der Tabelle die Werte unter Einbeziehung aller Biopsien dargestellt.

Tabelle 20: Vorhandensein von Myogenin, Zuordnung zu den Kategorien „chronisch“ und „akut“ und Menge der NCAM-negativen angulär-atrophen Fasern in Biopsien mit viel bzw. wenig NCAM- bzw. MHCn-positiven normal großen Fasern

	Biopsien mit wenig NCAM und wenig MHCn (35 Biopsien)	Biopsien mit viel NCAM und viel MHCn (9 Biopsien)	Biopsien mit wenig NCAM und viel MHCn (5 Biopsien)	Biopsien mit viel NCAM und wenig MHCn (15 Biopsien)	Alle Biopsien zusammen (64 Biopsien)
„chronisch“	7 (46,7%)	9 (100%)	2 (40%)	13 (37,1%)	31 (48,4%)
„akut“	8 (53,3%)	0 (0%)	3 (60%)	22 (62,9%)	33 (51,6%)
Myogenin-positive normal große Fasern vorhanden	4 (26,7%)	4 (44,4%)	3 (60%)	4 (11,4%)	15 (23,4%)
Keine Myogenin-positiven normal großen Fasern vorhanden	11 (73,3%)	5 (55,6%)	2 (40%)	31 (88,6%)	49 (76,6%)
Myogenin-positive Fasern	5 (33,3%)	5 (55,6%)	4 (80%)	8 (22,9%)	22 (34,4%)

Ergebnisse

vorhanden					
Keine Myogenin-positiven Fasern vorhanden	10 (66,7%)	4 (44,4%)	1 (20%)	27 (77,1%)	42 (65,6%)
Wenige NCAM-negative angulär-atrophe Fasern vorhanden	12 (80%)	8 (88,9%)	2 (40%)	11(31,4%)	33 (51,6%)
viele NCAM-negative angulär-atrophe Fasern vorhanden	3 (20%)	1(11,1%)	3 (60%)	24 (68,6%)	31 (48,4%)

Vergleicht man die Werte der Biopsien mit wenig NCAM-positiven und wenig MHCn-positiven normal großen Fasern mit den Werten aller Biopsien, so fällt auf, dass diese Biopsien häufiger vom „akuten“ Typ sind, eher Myogenin-negativ sind und viele NCAM-negative angulär-atrophe Fasern als Zeichen für Reinnervation aufweisen.

Bei den Biopsien mit viel NCAM-positiven und viel MHCn-positiven normal großen Fasern fällt auf, dass diese im Vergleich zu allen Biopsien zusammen genommen häufiger vom „chronischen“ Typ sind, eher Myogenin-positiv sind

und weniger NCAM-negative angulär-atrophe Fasern als Zeichen für Reinnervation aufweisen.

In den Biopsien mit wenig NCAM-positiven und viel MHCn-positiven normal großen Fasern liegen häufiger als im Gesamtkollektiv „akute“ Fälle vor. Im Gegensatz zu den Biopsien mit wenig NCAM-positiven und wenig MHCn-positiven normal großen Fasern kommen hier jedoch häufiger Myogenin-positiv Fasern vor. Im Vergleich zum Gesamtkollektiv finden sich häufiger NCAM-negative angulär-atrophe Fasern, allerdings nicht ganz so häufig wie in Biopsien, in denen von NCAM und von MHCn wenige positive normal große Fasern vorliegen.

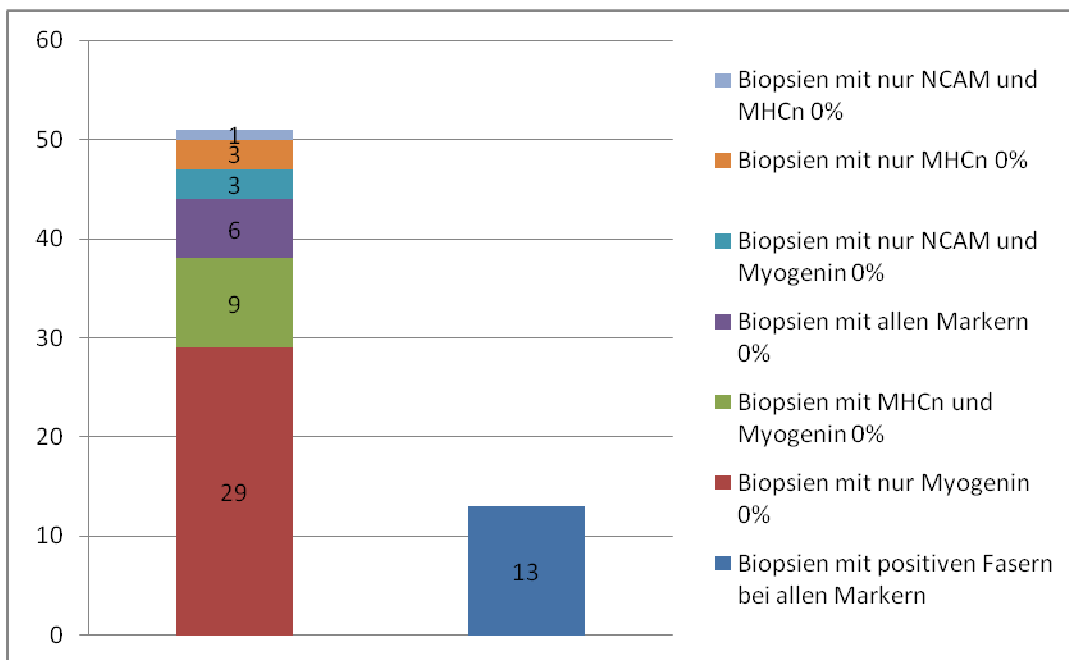
Die Biopsien mit viel NCAM-positiven und wenig MHCn-positiven normal großen Fasern entsprechen in ihrer Zuordnung zu den Kategorien „akut“ und „chronisch“ und in der Menge der Myogenin-positiven Fasern etwa dem Gesamtkollektiv. Lediglich bei der Menge der NCAM-negativen angulär-atropen Fasern weichen sie vom Gesamtkollektiv ab: Sie weisen auffällig selten NCAM-negative angulär-atrophe Fasern auf, was darauf hindeutet, dass hier weniger häufig Reinnervation stattgefunden hat als in anderen Biopsien.

3.5.4 Biopsien mit 0% positiven normal großen Fasern

Von den untersuchten Biopsien kommen in 51 gar keine NCAM- bzw. MHCn- bzw. Myogenin-positiven normal großen Fasern vor. In 13 Biopsien kommen sowohl NCAM- als auch MHCn- als auch Myogenin-positiv normal große Fasern vor. Am häufigsten kommen nur keine Myogenin-positiven normal großen Fasern vor. Dies ist in 29 Biopsien der Fall. In neun Biopsien kommen gleichzeitig keine Myogenin- und keine MHCn-positiven normal großen Fasern vor. In sechs Biopsien sind die normal großen Fasern für alle drei Marker negativ und in jeweils drei Biopsien sind keine MHCn-positiven normal großen Fasern zu finden bzw. gleichzeitig keine NCAM- und keine Myogenin-positiven normal großen Fasern. In einer Biopsie sind keine NCAM- und keine MHCn-positiven normal großen Fasern vorhanden, während Myogenin-positiv Fasern vorkommen. Es gibt keine Biopsie, in der es NCAM-positiv normal große

Fasern nicht gibt, MHCn- und Myogenin-positive normal große Fasern jedoch vorkommen (Diagramm 14).

Diagramm 14: Biopsien mit 0% normal großen Fasern: In den meisten Biopsien weist nur Myogenin 0% auf, häufig auch MHCn und Myogenin oder alle Marker; selten kommt es vor, dass Biopsien für NCAM und Myogenin 0% aufweisen und für MHCn positiv sind oder das nur MHCn negativ ist oder nur NCAM und MHCn, während Myogenin positiv ist.



3.6 Tenascin

3.6.1 Menge und Verteilung von Tenascin

Von 65 Biopsien fanden sich in 44 im untersuchten Bereich Tenascin-positive Muskelfasern (Abbildung 22). Dies entspricht 67,7% der Biopsien. Durchschnittlich sind von den untersuchten Fasern 7,7% (KI: 4,3-11,1%) Tenascin-positiv, die Menge der Tenascin-positiven Fasern liegt in allen Biopsien im Bereich zwischen 0% und 72,5%.

Von der Verteilung auf den Schnitten her unterscheidet sich Tenascin von den anderen untersuchten Markern. Während die anderen Marker meist gleichmäßig über den Schnitt verteilt sind, liegt Tenascin meist in Feldern von mehreren positiven Fasern vor. Hierbei sind große, angulär-atrophe und kleine Fasern gleichermaßen positiv (Abbildung 22). Eine Beziehung zu den anderen untersuchten Markern (NCAM, MHCn, Myogenin) ist nicht ersichtlich.

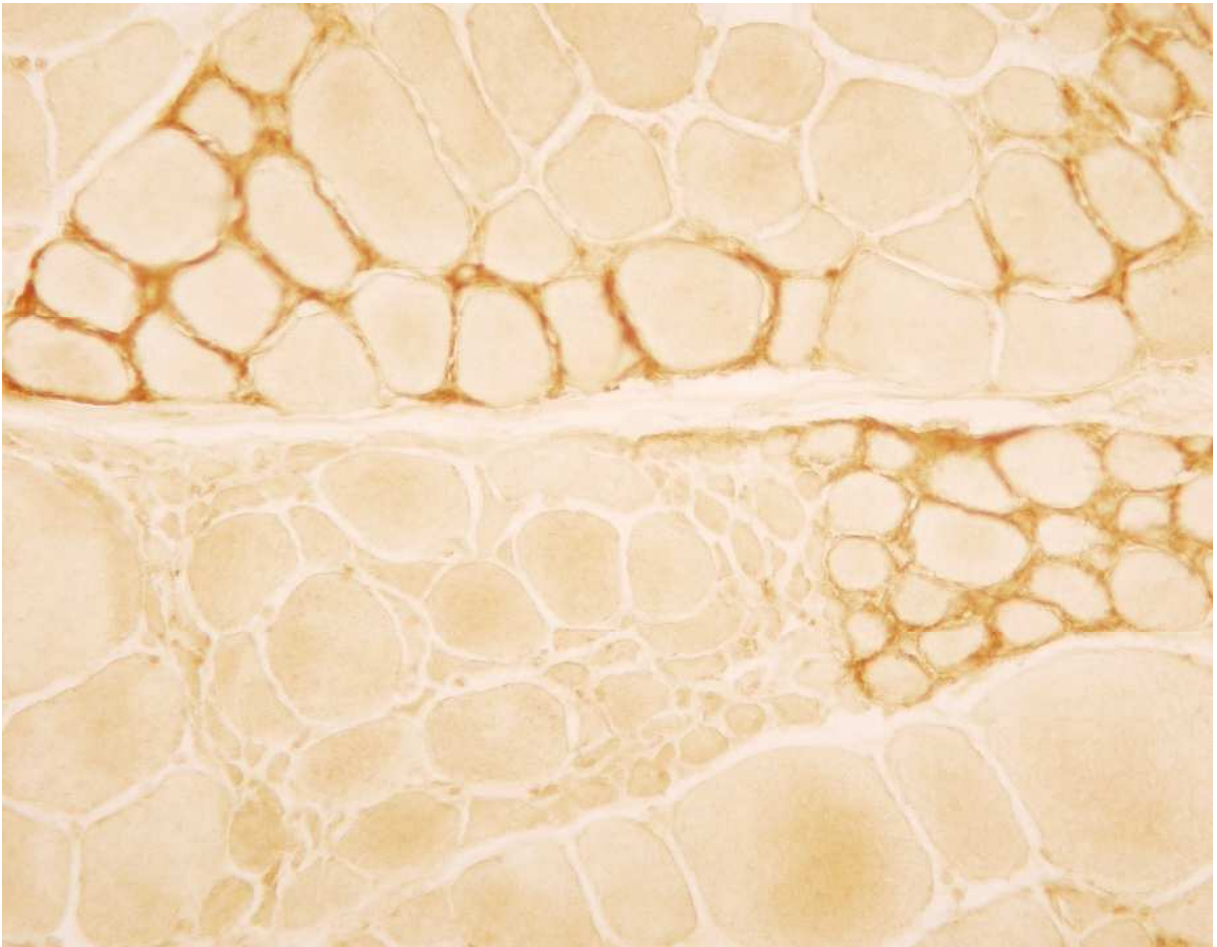


Abbildung 22: Die Tenascin-positiven Fasern verteilen sich felderförmig auf dem Schnitt. Dabei sind nicht wie bei den anderen Markern bevorzugt kleine und angulär-atrophe Fasern positiv, sondern jeweils alle Faserformen und -größen innerhalb eines positiven Areals.

3.6.2 Tenascin in „chronischen“ und „akuten“ Fällen

Untersucht man das Vorkommen von Tenascin-positiven Fasern getrennt für „chronische“ und „akute“ Fälle, so lässt sich feststellen, dass „chronische“ Fälle signifikant häufiger Tenascin-positive Fasern aufweisen als „akute“ Fälle ($p=0,0015$). In „akuten“ Fällen kommt es häufiger vor, dass im untersuchten Bereich gar keine Tenascin-positiven Fasern vorkommen (Tabelle 21).

Tabelle 21: Menge der Tenascin-positiven Fasern in „akuten“ und „chronischen“ Biopsien

	0% Tenascin- positive Fasern	1-33% Tenascin- positive Fasern	34-66% Tenascin- positive Fasern	67-100% Tenascin- positive Fasern	Durchschnittliche r Wert an Tenascin- positiven Fasern
„chronische“ Biopsien	5 Biopsien (16,1%)	23 Biopsien (74,2%)	1 Biopsie (3,2%)	2 Biopsien (6,4%)	12,8% (KI: 6,0- 19,5%)
„akute“ Biopsien	15 Biopsien (44,1%)	19 Biopsien (55,9%)	0 Biopsien (0%)	0 Biopsien (0%)	3,2% (KI: 1,3- 5,1%)

3.7 Vergleich der Menge der für einen Marker positiven kleinen Fasern, angulär-atropen Fasern und normal großen Fasern

3.7.1 Vergleich der durchschnittlichen Mengen an positiven kleinen, angulär-atropen und normal großen Fasern für die verschiedenen Marker

Tabelle 22: Durchschnittswerte an positiven Fasern für die verschiedenen Marker

	Myogenin	NCAM	MHCn
Normal große Fasern	1,8%	10,7%	4,9%
Angulär-atrophe Fasern	19,8%	33,0%	36,4%
Kleine Fasern	20,5%	40,8%	82,0%

In Tabelle 22 fällt auf, dass bei allen drei Marker die kleinen Fasern am häufigsten positiv sind. Für Myogenin ist der Unterschied zur Menge der positiven angulär-atropen Fasern nur gering, für MHCn ist er größer. Myogenin hingegen hat den relativ gesehen deutlichsten Abstand zwischen der Menge positiven normal großen Fasern und der Menge der positiven angulär-atropen Fasern, für NCAM ist dieser Abstand relativ gesehen am geringsten.

3.7.2 Vergleich der Mengen an positiven kleinen, angulär-atropen und normal großen Fasern für die verschiedenen Marker in den einzelnen Biopsien

3.7.2.1 Myogenin

In den Diagrammen 15 bis 17 sind die Mengen der Myogenin-positiven normal großen, angulär-atropen und kleinen Fasern in einem Diagramm dargestellt. Es fällt auf, dass die Menge der normal großen positiven Fasern immer unter

der Menge der angulär-atrophen und kleinen Fasern liegt. Desweiteren kann man sehen, dass die Menge der positiven kleinen und angulär-atrophen Fasern stark zusammenhängt. In Biopsien mit vielen positiven angulär-atrophen Fasern finden sich meist auch viele positive kleine Fasern und umgekehrt. Teilweise übersteigt die Menge der positiven kleinen Fasern die der positiven angulär-atrophen Fasern, teilweise ist es umgekehrt. In Biopsien, in denen keine kleinen Fasern vorkommen, liegen meist nur wenige positive normal große und angulär-atrophe Fasern vor.

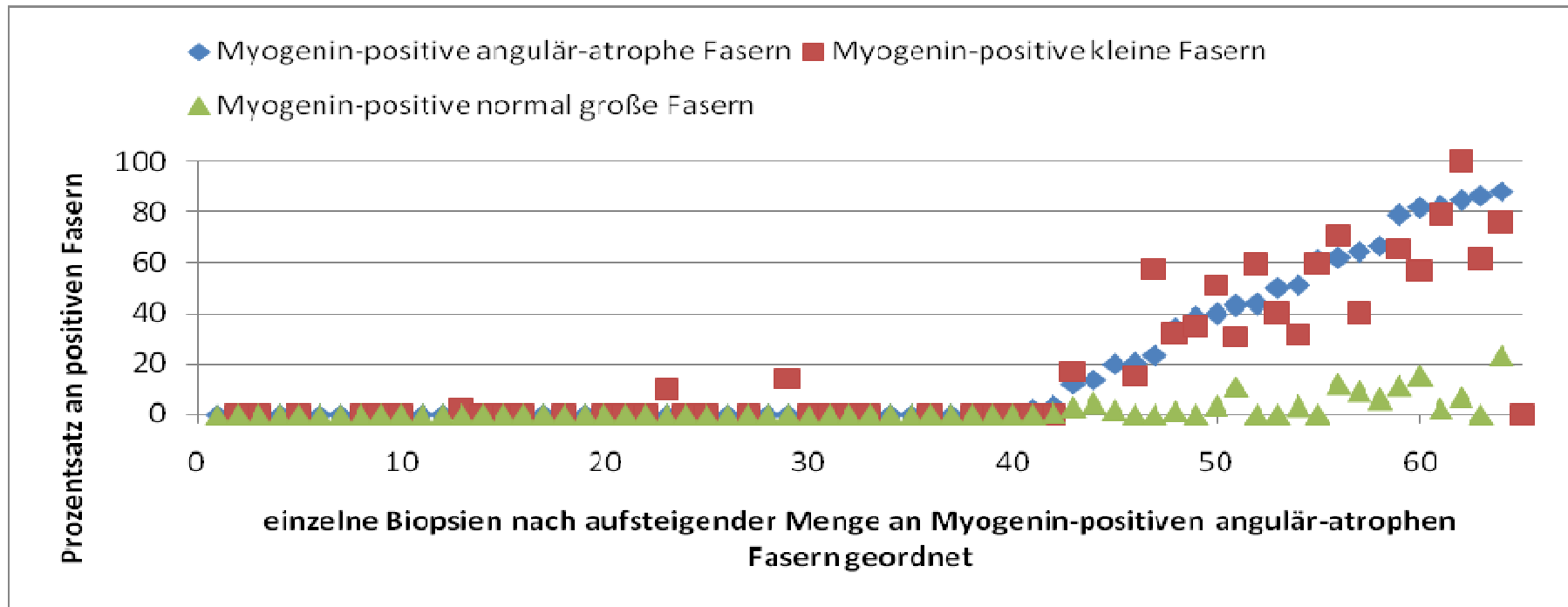


Diagramm 15: Verteilung der Prozentwerte der für Myogenin-positiven verschiedenen Faserformen in den einzelnen Biopsien, angeordnet nach aufsteigender Menge an Myogenin-positiven angulär-atrophe Fasern. Die Mengen der positiven normal großen Fasern liegen stets unter oder sind gleich der Menge der positiven angulär-atrophe und kleinen Fasern. In Biopsien, in denen viele positive angulär-atrophe Fasern vorkommen, liegen meist auch viele positive kleine Fasern vor. Die Menge der positiven kleinen Fasern liegt in manchen Biopsien über und in manchen Biopsien unter der Menge der positiven angulär-atrophe Fasern.

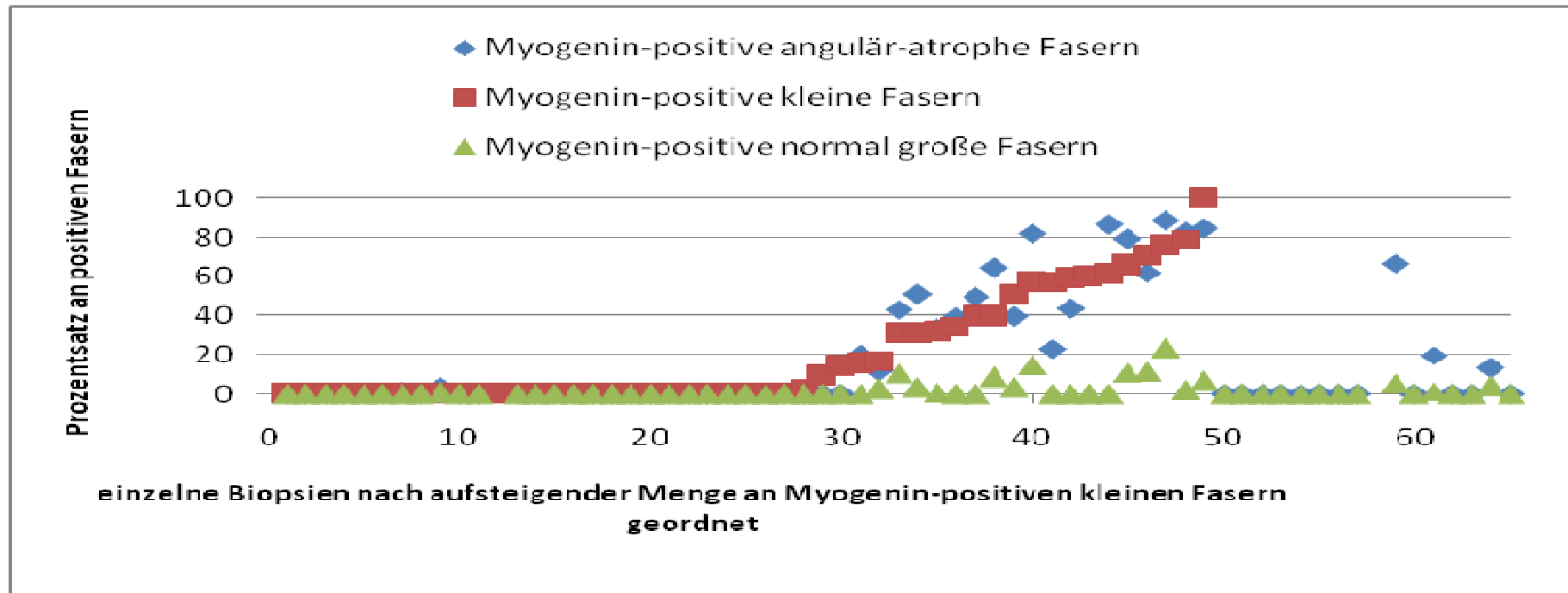


Diagramm 16: Verteilung der Prozentwerte der für Myogenin-positiven verschiedenen Faserformen in den einzelnen Biopsien, angeordnet nach aufsteigender Menge an Myogenin-positiven kleinen Fasern. Die Mengen der positiven normal großen Fasern liegen stets unter oder sind gleich der Menge der positiven angulär-atropen und kleinen Fasern. In Biopsien, in denen viele positive kleine Fasern vorkommen, liegen meist auch viele positive angulär-atrophe Fasern vor. Die Menge der positiven kleinen Fasern liegt in manchen Biopsien über und in manchen Biopsien unter der Menge der positiven angulär-atropen Fasern. In Biopsien, in denen keine kleinen Fasern vorkommen, kommen häufig nur wenige positive angulär-atropen und normal große Fasern vor.

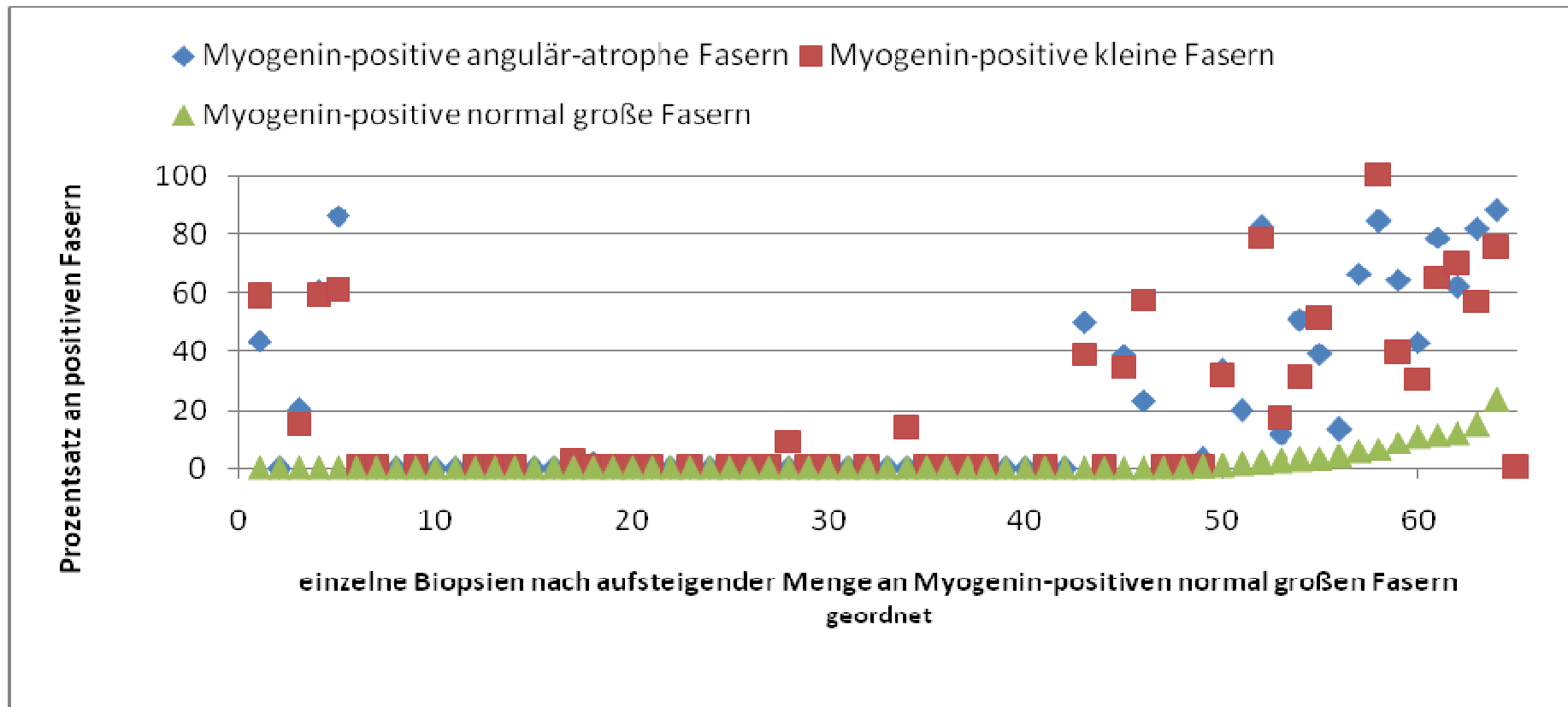


Diagramm 17: Verteilung der Prozentwerte der für Myogenin-positiven verschiedenen Faserformen in den einzelnen Biopsien, angeordnet nach aufsteigender Menge an Myogenin-positiven normal großen Fasern. Die Mengen der positiven normal großen Fasern liegen stets unter oder sind gleich der Menge der positiven angulär-atropen und kleinen Fasern. In Biopsien mit mehr positiven normal großen Fasern liegen auch eher mehr positive kleine und angulär-atrophe Fasern vor.

3.7.2.2 NCAM

In den Diagrammen 18 bis 20 sind die Mengen der NCAM-positiven normal großen, angulär-atrophen und kleinen Fasern in einem Diagramm dargestellt. Man kann sehen, dass die Menge der positiven normal großen Fasern wie auch bei Myogenin fast immer unter der Menge der positiven angulär-atrophen Fasern liegt. Meist liegt sie auch unter der Menge der kleinen Fasern, allerdings ist dies hier nicht so deutlich wie bei Myogenin der Fall. Die Menge der positiven kleinen Fasern übersteigt meist die Menge der positiven angulär-atrophen Fasern, jedoch liegt in einigen Biopsien auch die Menge der positiven angulär-atrophen Fasern über der Menge der positiven kleinen Fasern. Im Gegensatz zu Myogenin liegen bei NCAM in Biopsien mit vielen positiven angulär-atrophen Fasern nicht unbedingt viele positive kleine Fasern vor und umgekehrt. Zwischen der Menge der positiven kleinen und angulär-atrophen Fasern ist keine direkte Assoziation abzulesen. Vergleicht man jedoch die Menge der positiven angulär-atrophen Fasern mit der Menge der positiven normal großen Fasern, so kann man feststellen, dass in Biopsien mit vielen positiven angulär-atrophen Fasern häufiger viele positive normal große Fasern vorkommen als in Biopsien mit wenigen positiven angulär-atrophen Fasern und umgekehrt. Vergleicht man die Menge der positiven normal großen Fasern mit der Menge der positiven kleinen Fasern, so fällt auf, dass in Biopsien mit wenigen oder vielen positiven kleinen Fasern häufiger viele positiven normal große Fasern vorkommen als in Biopsien mit einer mittleren Menge an positiven kleinen Fasern. In Biopsien, in denen keine kleinen Fasern vorliegen, sind auffallend häufig viele positive normal große Fasern zu finden.

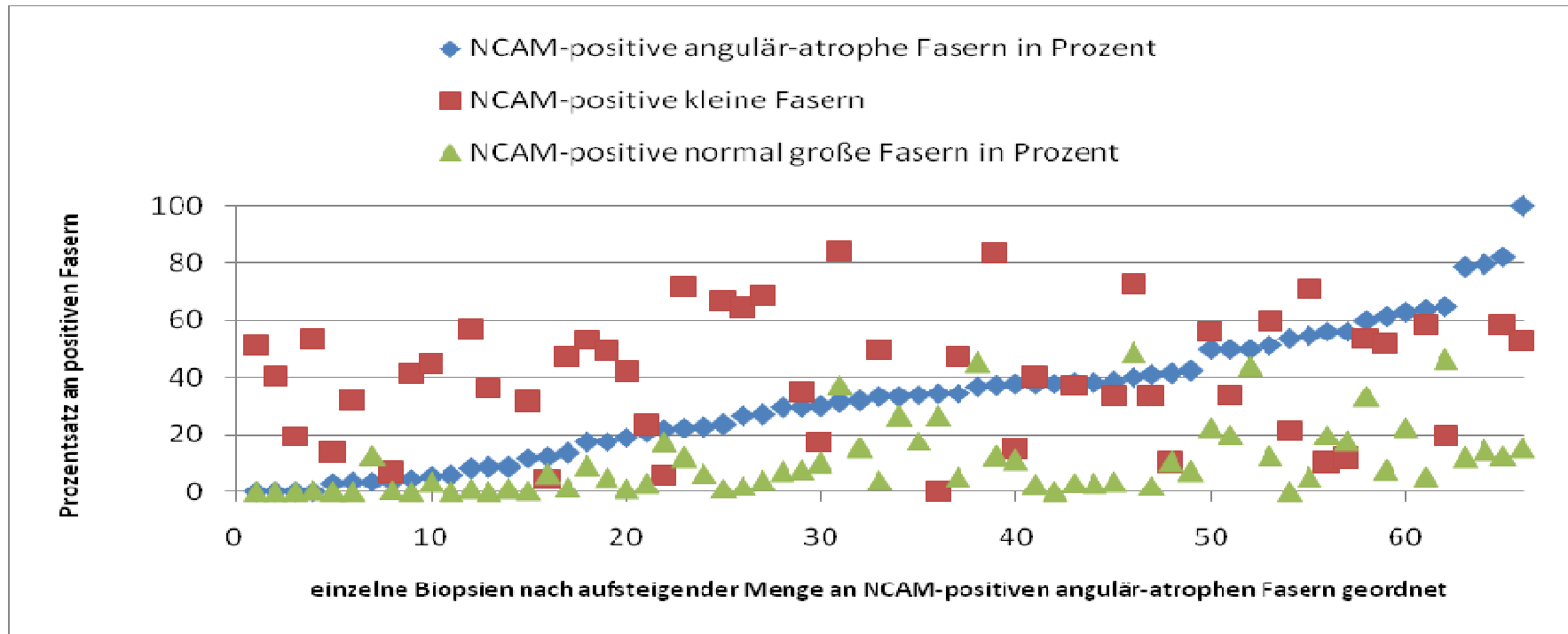


Diagramm 18: Verteilung der Prozentwerte der für NCAM-positiven verschiedenen Faserformen in den einzelnen Biopsien, angeordnet nach aufsteigender Menge an NCAM-positiven angulär-atrophe Fasern. Die Menge der positiven normal großen Fasern liegen fast immer unter der Menge der positiven angulär-atrophe Fasern. Die Menge der positiven kleinen Fasern liegt in der Mehrzahl der Fälle über der Menge der positiven angulär-atrophe Fasern. In Biopsien mit vielen positiven angulär-atrophe Fasern kommen eher auch höhere Werte an positiven normal großen Fasern vor als in Biopsien mit wenigen positiven angulär-atrophe Fasern.

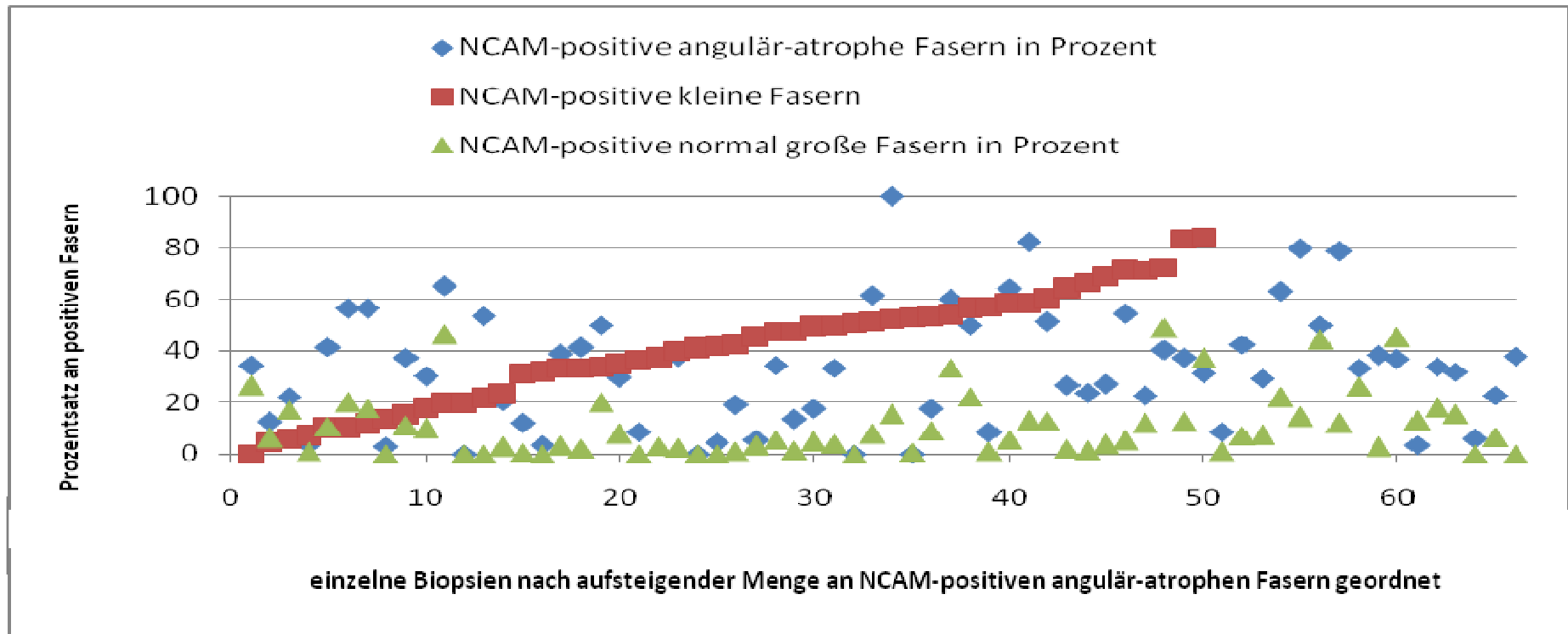


Diagramm 19: Verteilung der Prozentwerte der für NCAM-positiven verschiedenen Faserformen in den einzelnen Biopsien, angeordnet nach aufsteigender Menge an NCAM-positiven kleinen Fasern. Die Menge der positiven normal großen Fasern liegt fast immer, die Menge der positiven angulär-atropen Fasern meist unter der Menge der positiven kleinen Fasern. In Biopsien mit vielen positiven kleinen Fasern und in Biopsien mit wenigen kleinen Fasern kommen häufiger höhere Werte an positiven normal großen Fasern vor als in Biopsien mit einer mittleren Menge an positiven kleinen Fasern. In Biopsien, in denen gar keine kleinen Fasern vorkommen, kommen eher viele positive normal große Fasern vor.

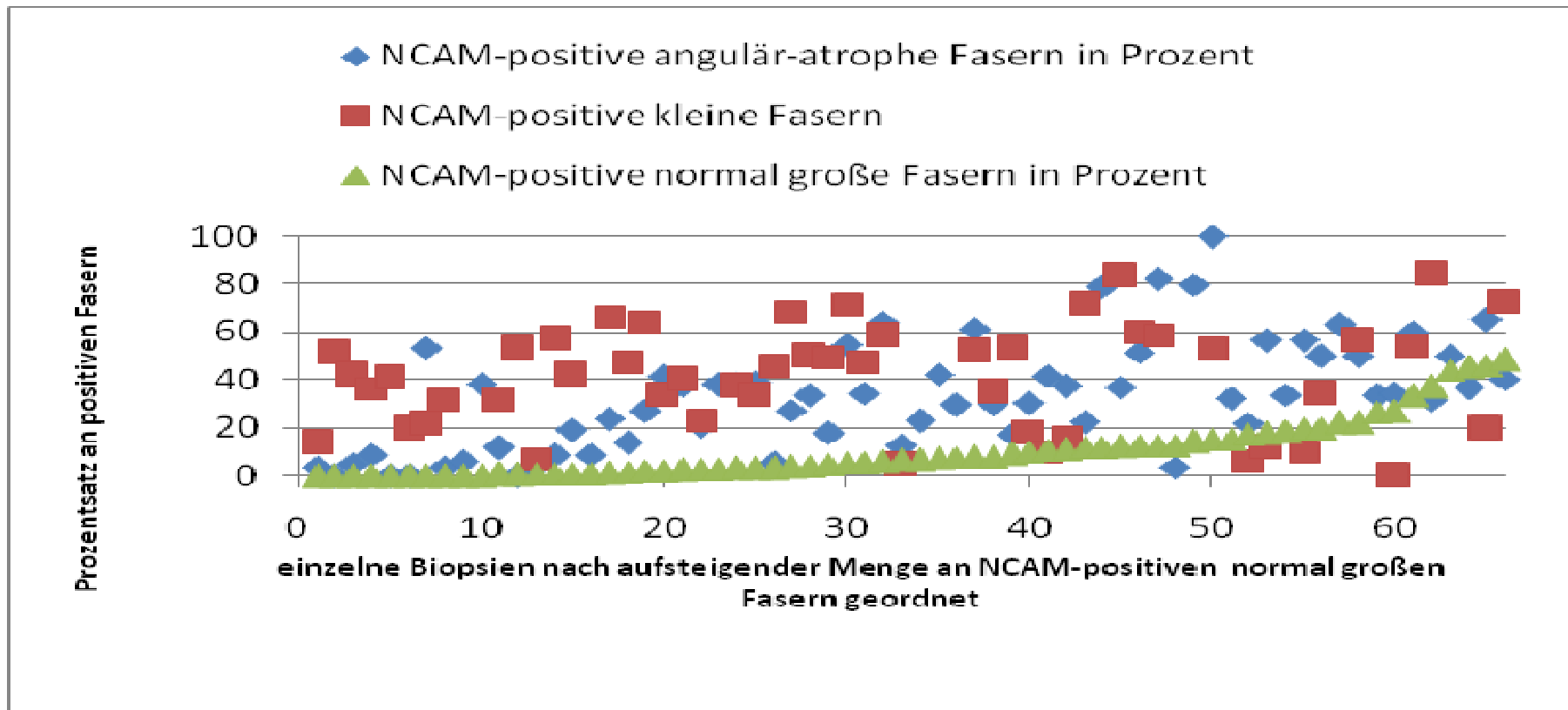


Diagramm 20: Verteilung der Prozentwerte der für NCAM-positiven verschiedenen Faserformen in den einzelnen Biopsien, angeordnet nach aufsteigender Menge an NCAM-positiven normal großen Fasern. Die Mengen der positiven kleinen und angulär-atropen Fasern liegen fast immer unter der Menge der positiven normal großen Fasern. In Biopsien mit vielen positiven normal großen Fasern liegen auch eher viele positive normal große Fasern vor, zur Menge der positiven kleinen Fasern ist keine deutliche Assoziation zu erkennen.

3.7.2.3 MHCn

In den Diagrammen 21 bis 23 sind die Mengen der MHCn-positiven normal großen, angulär-atrophen und kleinen Fasern in einem Diagramm dargestellt. In Diagramm 21 ist deutlich zu sehen, dass die Menge der positiven kleinen Fasern stets über der Menge der positiven angulär-atrophen Fasern liegt, die Menge der positiven normal großen Fasern darunter. In Biopsien mit vielen positiven angulär-atrophen Fasern kommen etwas häufiger positive normal große Fasern vor als in Biopsien mit weniger positiven angulär-atrophen Fasern. In den Biopsien, in denen keine kleinen Fasern vorkommen, kommen weniger positive normal große und angulär-atrophen Fasern vor als in Biopsien mit kleinen Fasern. In Biopsien mit weniger positiven kleinen Fasern kommen auch weniger positive angulär-atrophe Fasern vor. Eine Assoziation zur Menge der positiven normal großen Fasern ist nicht erkennbar. In Biopsien mit vielen positiven normal großen Fasern kommen häufiger positive angulär-atrophe Fasern vor als in Biopsien mit wenigen positiven normal großen Fasern.

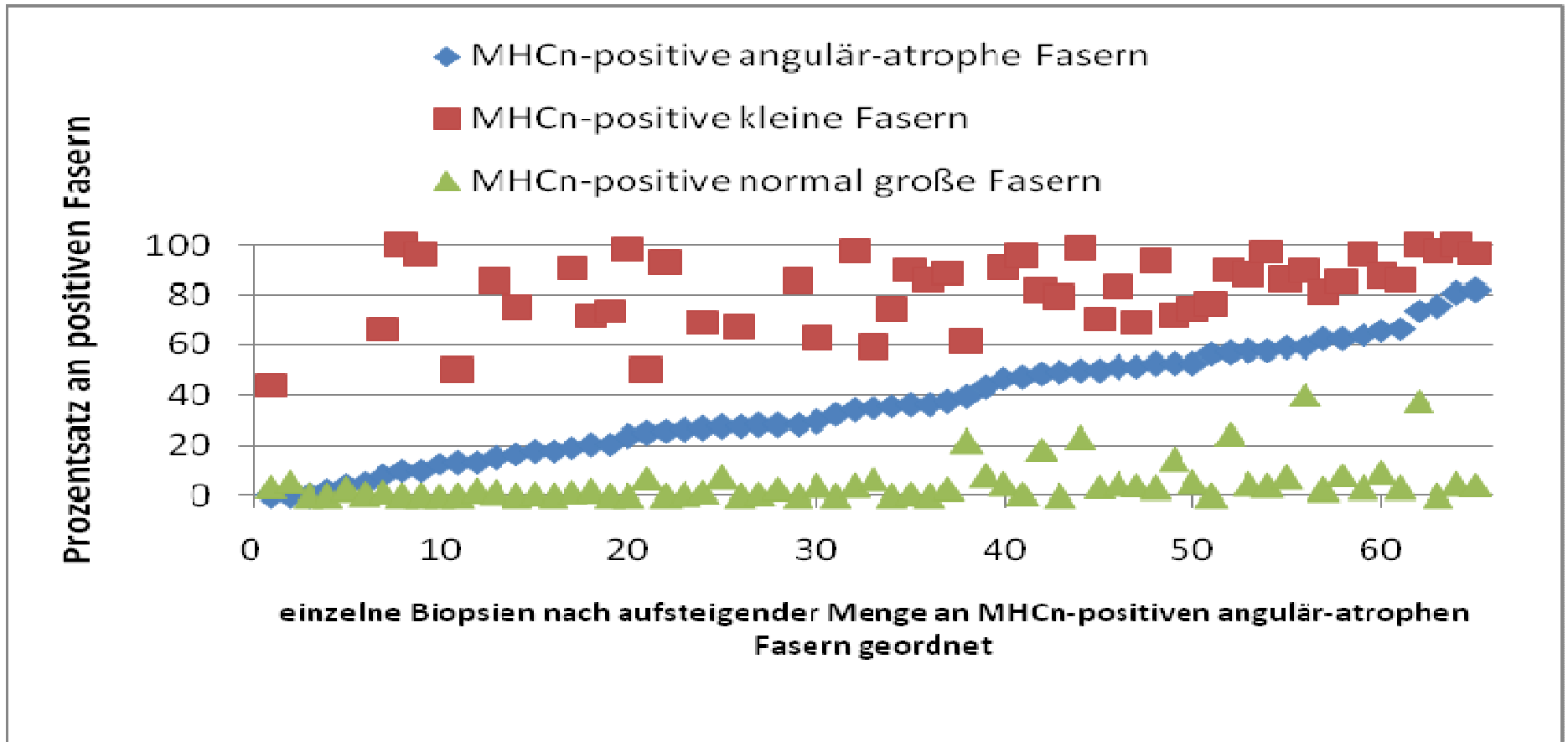


Diagramm 21: Verteilung der Prozentwerte der für MHCn-positiven verschiedenen Faserformen in den einzelnen Biopsien, angeordnet nach aufsteigender Menge an MHCn-positiven angulär-atropen Fasern. Die Mengen der positiven kleinen Fasern liegen stets über der Menge der positiven angulär-atropen Fasern, die der normal großen Fasern darunter. In Biopsien mit vielen positiven angulär-atropen Fasern kommen eher auch mehr positive normal große Fasern vor.

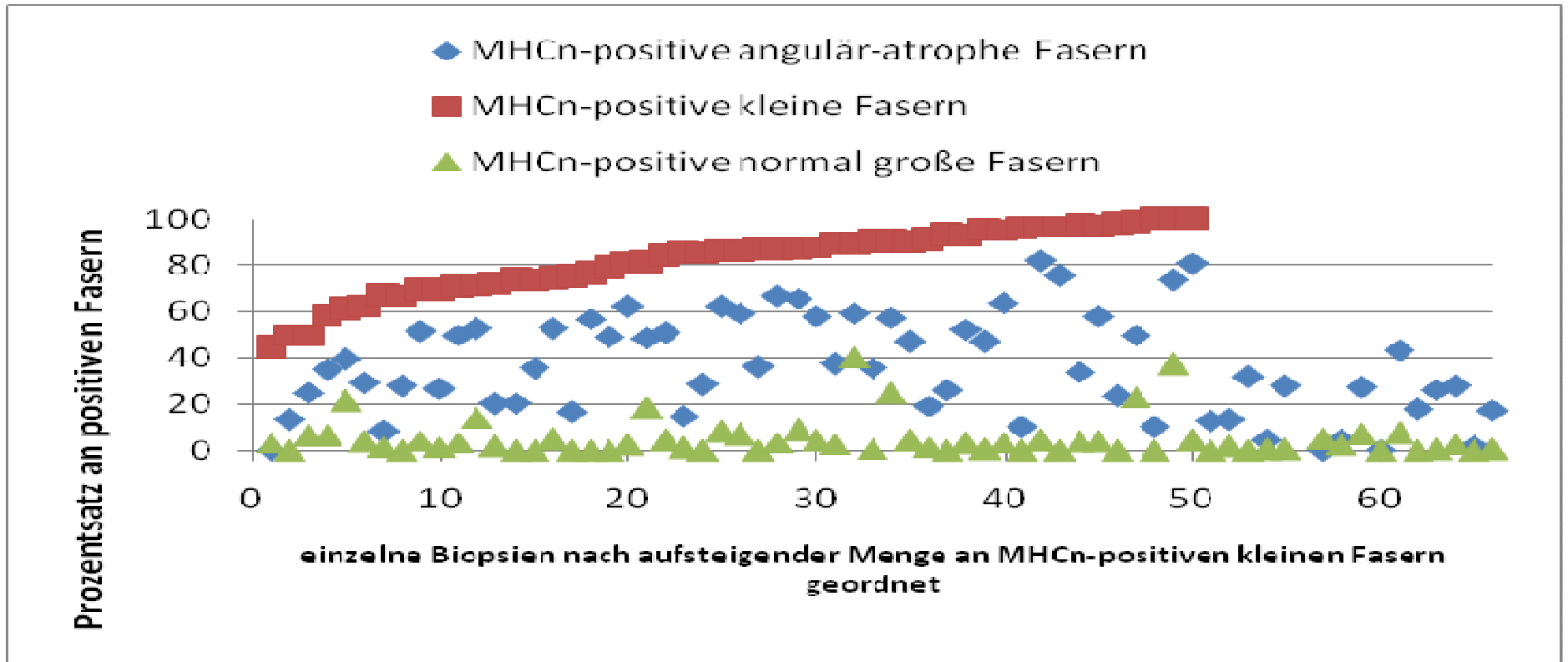


Diagramm 22: Verteilung der Prozentwerte der für MHCn-positiven verschiedenen Faserformen in den einzelnen Biopsien, angeordnet nach aufsteigender Menge an MHCn-positiven kleinen Fasern. Die Menge der positiven angulär-atropen und normal großen Fasern liegt stets unter der Menge der positiven kleinen Fasern. In Biopsien, in denen keine kleinen Fasern vorkommen, kommen weniger positive normal große und angulär-atropen Fasern vor als in Biopsien mit kleinen Fasern. In Biopsien mit mehr positiven kleinen Fasern kommen eher auch mehr positive angulär-atrophe Fasern vor.

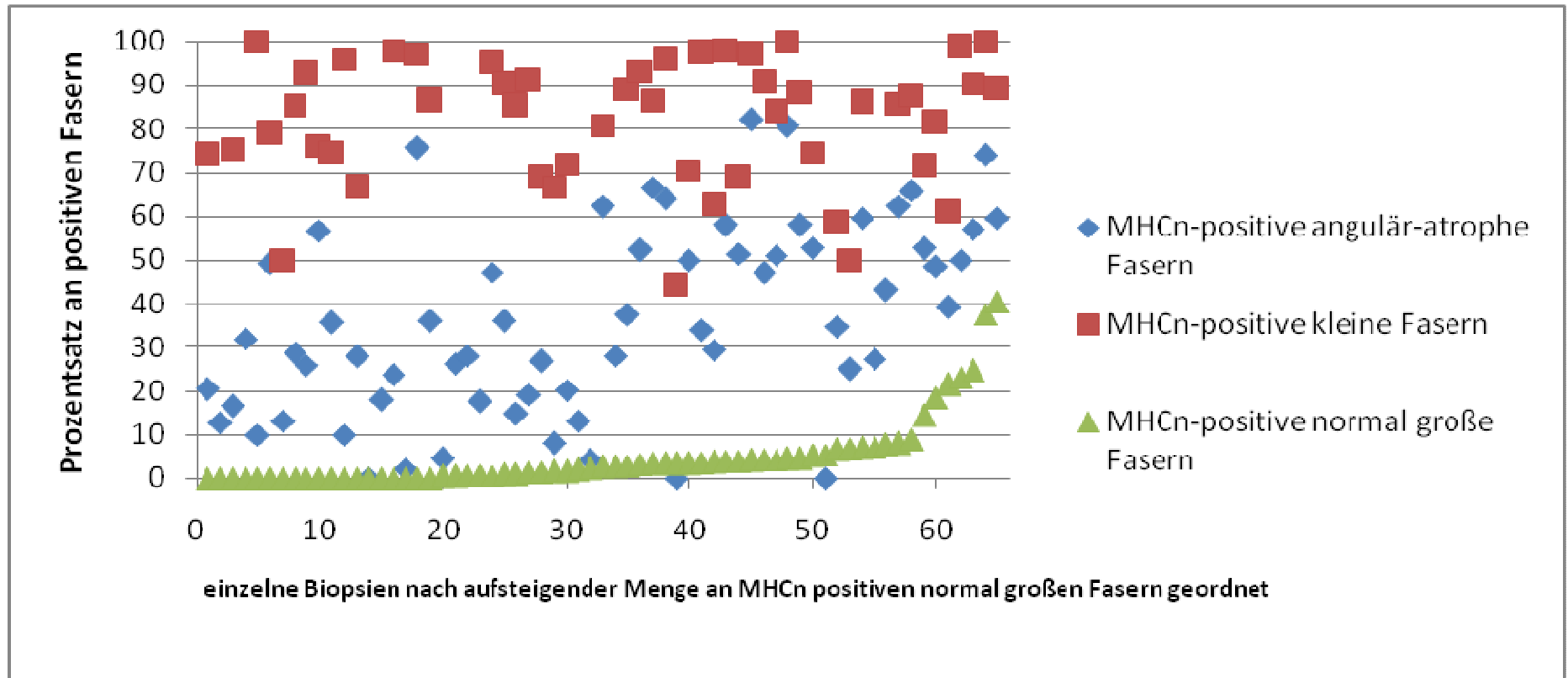


Diagramm 23: Verteilung der Prozentwerte der für MHCn-positiven verschiedenen Faserformen in den einzelnen Biopsien, angeordnet nach aufsteigender Menge an MHCn-positiven normal großen Fasern. Die Menge der positiven kleinen und angulär-atropen Fasern liegt fast immer über der Menge der positiven normal großen Fasern. In Biopsien mit vielen positiven normal großen Fasern kommen häufiger viele positive angulär-atropen Fasern vor als in Biopsien mit wenigen positiven normal großen Fasern.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei Myogenin eine enge Assoziation zwischen der Menge der positiven angulär-atrophischen und kleinen Fasern besteht. Die Menge der positiven angulär-atrophischen und kleinen Fasern übersteigt hier immer die Menge der positiven normal großen Fasern.

Bei NCAM ist keine direkte Assoziation zwischen der Menge der positiven angulär-atrophischen und kleinen Fasern zu erkennen. Die Menge der positiven normal großen Fasern liegt jedoch fast immer unter der Menge der positiven angulär-atrophischen und kleinen Fasern.

Auch bei MHCn ist keine direkte Assoziation zwischen der Menge der positiven angulär-atrophischen und kleinen Fasern zu erkennen. Es fällt jedoch auf, dass die Menge der kleinen Fasern stets über der Menge der angulär-atrophischen Fasern liegt und die Menge der angulär-atrophischen Fasern stets über der Menge der normal großen Fasern.

In Biopsien, in denen keine kleinen Fasern vorkommen, kommen deutlich häufiger NCAM-positive normal große Fasern vor und auch NCAM-positive angulär-atrophische Fasern sind etwas häufiger als in Biopsien mit kleinen Fasern. MHCn- bzw. Myogenin-positive normal große und angulär-atrophische Fasern kommen allerdings weniger häufig vor als in Biopsien mit kleinen Fasern.

4. Diskussion

4.1 Morphologische Veränderungen

Innerhalb der untersuchten Biopsien fällt auf, dass sich die einzelnen Fasern hinsichtlich Form und Größe stark von einander unterscheiden.

Auch zwischen den einzelnen Biopsien gibt es große Unterschiede hinsichtlich der Morphologie: Manche Biopsien ähneln stark gesunder Muskulatur, während andere Biopsien viele Allgemeinveränderungen, wie Fibrose und Fettzellen zeigen (Abbildungen 11 und 12).

Die Unterschiede innerhalb der Biopsien lassen sich dadurch erklären, dass bei neurogener Atrophie im Gegensatz zur Denervation im Tierexperiment nicht alle Fasern zum gleichen Zeitpunkt denerviert werden. Die Denervation in Muskelbiopsien wird durch Erkrankungen wie Polyneuropathie oder Amyotrophe Lateralsklerose ausgelöst, welche keine akuten Ereignisse darstellen, sondern Prozesse, die dazu führen, dass über einen längeren Zeitraum Nervenfasern bzw. Motoneurone zugrunde gehen. In den Biopsien liegen daher nebeneinander Muskelfasern vor, die sich in verschiedenen Phasen der Denervation befinden, noch innerviert oder schon reinnerviert sind. Voytik und Mitarbeiter konnten feststellen, dass das Ausmaß der Atrophie von denervierten Muskelfasern mit der Dauer der Denervation zunimmt (Voytik et al., 1993). Die erklärt das Vorliegen von unterschiedlich stark atrophierten Fasern innerhalb der untersuchten Muskelbiopsien. Viele verschiedene Arbeiten an humanen Muskelbiopsien in der Vergangenheit haben gezeigt, dass das gleichzeitige Vorliegen von normal großen und atrophen Fasern für humane Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie typisch ist (Manz, 1980; Bank und Engel, 2004). Die Morphologie der von uns untersuchten Biopsien entspricht daher den Erwartungen.

Die großen morphologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Biopsien lassen sich am ehesten auch durch den zeitlichen Verlauf der Denervation erklären. Tews und Mitarbeiter konnten an mimischer Muskulatur der Ratte

zeigen, dass das Ausmaß der Fibrose von der Dauer der Denervation abhängig ist (Tews et al., 1994). Berücksichtigt man dies, so sind unterschiedlich starke allgemeine morphologische Unterschiede zwischen den einzelnen Biopsien durchaus zu erwarten. Da sich die biopsierten Patienten in unterschiedlichen Stadien ihrer Erkrankung befinden können und die zur Denervation führenden Erkrankungen auch unterschiedlich verlaufen können, erscheint es einleuchtend, dass die unterschiedlichen Biopsien große Unterschiede aufweisen. Die im Ergebnisteil gewählte Unterteilung der Biopsien in die Kategorien „chronisch“ und „akut“ ist daher sinnvoll, da man durch das Ausmaß der Allgemeinveränderungen tatsächlich bestimmte Schlüsse auf den zeitlichen Verlauf der ursächlichen Erkrankung schließen kann.

4.2 Angulär-atrophe Fasern

Angulär-atrophe Fasern gelten als sicher denerviert. In den untersuchten Biopsien fällt jedoch auf, dass viele angulär-atrophe Fasern NCAM- und MHCn-negativ sind. Die Menge an NCAM- und MHCn-positiven angulär-atropen Fasern unterscheidet sich nicht signifikant ($p=0,28$) und beträgt für NCAM 33,0% (95%-Konfidenzintervall: 27,4-38,6%) und für MHCn 36,4% (95%-KI: 31,0-41,8%), während Myogenin deutlich seltener exprimiert wird, nämlich nur von 18,0% (95%-KI: 10,8-25,2%) aller angulär-atropen Fasern (Tabellen 3 bis 5).

Verschiedene Arbeiten in der Vergangenheit erwähnten das Vorkommen von NCAM-negativen angulär-atropen Fasern in humanen Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie (Cashman et al., 1987; Figarella-Branger et al., 1990, Illa et al., 1992). Genaue Angaben über die Menge der angulär-atropen Fasern in humanen Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie finden sich jedoch in keiner dieser Arbeiten, so dass der geringe Prozentsatz an NCAM-positiven angulär-atropen Fasern überrascht. Da angulär-atrophe Fasern sicher denerviert sind oder waren und denervierte Muskelfasern NCAM exprimieren (Covault und Sanes, 1985), müssen NCAM-negative angulär-atrophe Fasern reinnerviert worden sein, denn nach Reinnervation geht die Expression von NCAM zurück

(Covault und Sanes, 1985). NCAM ist in denervierten Muskelfasern ab zwei Tagen nach Denervation immunhistochemisch nachweisbar (Covault und Sanes, 1985), während die Atrophie der Fasern erst etwas später erfolgt (Voytik et al., 1993). Dies schließt aus, dass atrophierte Fasern denerviert sind und die Expression von NCAM noch erfolgt. Reinnervation ist somit die einzige Erklärung für das Vorliegen von NCAM-negativen angulär-atropen Fasern und diese können als Zeichen für Reinnervation gewertet werden.

Bei Betrachtung der Menge der NCAM- und MHCn-positiven angulär-atropen Fasern in den einzelnen Biopsien, fällt auf, dass diese keineswegs immer gleich ist (Abbildungen 13 und 16). In einigen Biopsien gibt es mehr NCAM-positiven angulär-atropen Fasern, in anderen Biopsien mehr MHCn-positiven angulär-atropen Fasern (Diagramme 3 bis 5). Es muss also Fasern geben, die nur einen der beiden Marker exprimieren.

Berücksichtigt man, dass NCAM früher als MHCn exprimiert wird (Covault und Sanes, 1985, Schiaffino et al., 1988) und nach Reinnervation sehr schnell zurückgeht (Covault und Sanes, 1985), so ergibt sich folgende Erklärung: NCAM-positiven angulär-atropen Fasern, die für MHCn negativ sind, müssen frisch denerviert sein, d.h. NCAM ist schon positiv, während MHCn erst noch positiv wird. MHCn-positiven angulär-atropen Fasern, die für NCAM negativ sind, müssen frisch reinnerviert sein, d.h. MHCn ist noch positiv, während NCAM schon zurückgegangen ist. Angulär-atropen Fasern, die für beide Marker negativ sind, müssen demnach reinnerviert sein, während Fasern, die für beide Marker positiv sind, denerviert sein müssen. Daraus ergibt sich die Möglichkeit bei Vergleich der Immunreaktivität für NCAM und MHCn einer Faser auf den Innervationszustand dieser Faser zu schließen.

Mit 18,0% (95%-KI: 10,8-25,2%) an positiven angulär-atropen Fasern war Myogenin im Vergleich zu NCAM und MHCn auffallend selten positiv. In 37 Biopsien (entspricht 57,8%) waren gar keine Myogenin-positiven angulär-atropen Fasern zu finden.

Dies ist verwunderlich, da Experimente an der Ratte gezeigt haben, dass Myogenin bereits 2,5 Tage nach Denervation immunhistochemisch nachweisbar ist (Weis, 1994) und alle untersuchten Biopsien aufgrund des Vorkommens von angulär-atrophischen Fasern und NCAM- und MHCn-positiven Fasern sicher Denervation aufweisen.

Doch andere Arbeiten, die ebenfalls mit humanen Muskelbiopsien gearbeitet haben, zeigen ähnliche Ergebnisse wie die vorliegende Arbeit: Parham und Mitarbeiter untersuchten acht Biopsien mit neurogener Atrophie auf ihre Immunreaktivität für MyoD1, einem Denervationsmarker, der einem ähnlichen Expressionsmuster folgt wie Myogenin. Dabei zeigten drei Biopsien viele positive angulär-atrophische Fasern, drei Biopsien nur wenige positive angulär-atrophische Fasern und zwei Biopsien waren komplett negativ (Parham et al., 1994). Olivé und Mitarbeiter untersuchten drei Biopsien mit neurogener Atrophie auf ihre Immunreaktivität für Anti-Myogenin und Anti-MyoD. Dabei waren alle drei Biopsien sowohl Myogenin- als auch MyoD-negativ (Olivé et al., 1997). Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Biopsien in diesen Arbeiten macht es wenig Sinn, diese direkt mit den Werten aus der vorliegenden Arbeit zu vergleichen. Doch legen alle Arbeiten zusammen betrachtet die Annahme nahe, dass Myogenin im Gegensatz zu NCAM und MHCn in humanen Muskelbiopsien keinen zuverlässigen Denervationsmarker darstellt. Sowohl die Arbeiten an der Ratte als auch das Vorkommen von Myogenin-positiven angulär-atrophischen Fasern in dieser Arbeit und der Arbeit von Parham und Mitarbeitern, weisen zwar nach, dass denervierte Fasern Myogenin exprimieren können, doch zeigen die Arbeiten an humanen Muskelbiopsien auch, dass bei weitem nicht alle denervierten Fasern Myogenin exprimieren und in einigen Fällen von neurogener Atrophie in humaner Skelettmuskulatur kein Myogenin exprimiert wird. Warum dies so ist, ist momentan unklar. Dass es allein daran liegt, dass Myogenin nur in den Kernen exprimiert wird und diese nicht immer in der Schnittebene liegen, ist äußerst unwahrscheinlich. Die Beobachtung, dass die Biopsien, die Myogenin exprimieren, oft relativ viele Myogenin-positiv gefärbte Fasern aufweisen, lässt vermuten, dass es individuelle Unterschiede in der Expression von Myogenin

gibt oder dass Myogenin nur in einem kurzen Zeitpunkt während des Denervationsprozesses exprimiert wird. Zu letzterem passt die Beobachtung von Weis an der Ratte, dass die Expression von Myogenin acht Tage nach Denervation wieder zurückgeht (Weis, 1994).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den untersuchten Biopsien auffallend häufig NCAM-negative angulär-atrophe Fasern vorkommen, was auf ein großes Maß an Reinnervation schließen lässt. NCAM und MHCn zeigen in der Menge der positiven angulär-atropen Fasern zwar keinen Unterschied, bei Betrachtung einzelner Biopsien oder einzelner Fasern zeigen sich jedoch Unterschiede, wodurch man in Anbetracht der aus der Literatur bekannten verschiedenen Expressionszeitpunkte der beiden Marker den Innervationszustand der Fasern mutmaßen kann.

Myogenin-positive angulär-atrophe Fasern finden sich nur selten, was nahe legt, dass Myogenin kein guter Denervationsmarker für humane Muskelbiopsien ist.

4.3 Kleine Fasern

In 75,8 % der untersuchten Biopsien finden sich neben angulär-atropen und normal großen Fasern auch kleine Fasern. Im Durchschnitt sind 82,0% (95%-KI: 78,0-86,1%) dieser kleinen Fasern MHCn-positiv, während nur durchschnittlich 40,8% NCAM-positiv (95%-KI: 34,7-47,0%) und nur 20,5% Myogenin-positiv (KI:12,3-28,6%) sind (Tabellen 11 bis 13). Das Vorkommen von kleinen Fasern in Biopsien mit neurogener Atrophie stellt eine Überraschung dar, da kleine Fasern bisher nur aus myopathischen Biopsien, wie z.B. bei Myositis oder Muskeldystrophie bekannt sind. Dort stellen sie regenerierende Fasern dar.

Regenerierende Fasern wurden auch nach Denervation beschrieben. Die Regeneration wird dabei durch Nekrose induziert. Die entstehenden Myotuben können kleine Muskelfasern darstellen und mit Anti-MHCn reagieren. Cerny und Bandman beschreiben solche kleine Muskelfasern, die nach Induktion von

Regeneration durch Erfrierung vor allem in denerviertem Muskel auftreten. Diese reagierten mit Antikörpern gegen embryonales MHC. An der Grenze zum nicht regenerierenden Gewebe fielen kleine Fasern auf, die MHCn-positiv waren. Cerny und Bandman interpretierten diese kleinen Fasern als regenerierende Fasern und gingen davon aus, dass die MHCn-positiven Fasern in ihrer Entwicklung weiter fortgeschritten waren als die nur für embryonales MHC positiven Fasern (Cerny und Bandman, 1987). Schiaffino und Mitarbeitern fielen nach Denervation kleine Muskelfasern auf, die Reaktivität für Antikörper gegen embryonales MHC und gegen MHCn zeigten. Sie betrachteten diese aufgrund ihrer Reaktivität gegenüber MHCn als regenerierende Fasern (Schiaffino et al., 1988).

Für die Entstehung der kleinen Muskelfasern in der vorliegenden Arbeit liefert Regeneration jedoch keine hinreichende Erklärung, da Regenerationsvorgänge durch die Wahl von Biopsien ohne basophile Areale und ohne Reaktivität für Vimentin ausgeschlossen wurden. Außerdem sind durch Regeneration entstandene Myotuben größer als die kleinen Muskelfasern in unseren Biopsien.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Entstehung dieser kleinen Muskelfasern wäre eine fortschreitende Atrophie der angulär-atrophen Fasern. Da sich die kleinen Muskelfasern jedoch im Expressionsmuster der Denervationsmarker stark von den angulär-atrophen Fasern unterscheiden und signifikant mehr MHCn als NCAM exprimieren ($p < 0,0001$), was bei angulär-atrophen Fasern nicht der Fall ist, erscheint es unwahrscheinlich, dass die kleinen Fasern die weitere Entwicklung der angulär-atrophen Fasern im Denervationsprozess darstellen.

Auf die Größe der kleinen Fasern atrophierte Muskelfasern werden in der Literatur als sogenannte „Nuclear Clumps“ beschrieben (Banker und Engel, 2004) (Abbildung 10). Diese unterscheiden sich von den in dieser Arbeit vorliegenden kleinen Fasern durch eine größere Anzahl an Muskelkernen pro Faser.

Doch weisen einige Arbeiten darauf hin, dass außer durch Regeneration noch auf eine andere Art und Weise in denervierter Muskulatur neue Muskelfasern entstehen können: durch Myogenesevorgänge. Hierüber ist bisher noch nicht viel bekannt, doch konnten einige Arbeiten zeigen, dass nach Denervation aus Satellitenzellen im Rahmen von Myogenese neue kleine Muskelfasern entstehen können.

Schultz beschrieb 1978 in Clustern vorliegende kleine Muskelfasern, die zwei bis drei Wochen nach Denervation von Ratten- und Mausmuskulatur auftraten. Er erklärte sich die Entstehung dieser Fasern durch die Bildung von Myotuben aus Satellitenzellen. Satellitenzellen lösen sich von Muskelfasern ab, proliferieren, fusionieren und bilden so Myotuben (Schultz, 1978). Bei den von Schultz beschriebenen in Clustern vorliegenden kleinen Fasern, könnte es sich um die gleiche Art von Fasern handeln, wie in unseren Biopsien.

Borisov und Mitarbeiter untersuchten die in denerviertem Muskel auftretenden kleinen Fasern näher. Sie fanden zwei muskuläre Reaktionen auf Denervation, die zur Bildung von kleinen Muskelfasern führen: Zum einen Regeneration als Antwort auf einen Muskelfaserverlust und zum anderen die Bildung von Myotuben aus Satellitenzellen. Ein Maximum der Bildung von Myotuben konnte zwei bis vier Monate nach Denervation festgestellt werden, nach vier bis fünf Wochen konnten jedoch schon kleine Fasern nachgewiesen werden (Borisov et al., 2001). In einer weiteren Studie untersuchten Borisov und Mitarbeiter unter anderem das Verhältnis dieser durch Myogenese entstandenen kleinen Fasern zur Basalmembran und konnten feststellen, dass die neu entstandenen kleinen Fasern eine eigene Basalmembran besitzen, die sie ohne Falten aufzuweisen umgibt. Durch Regeneration entstandene kleine Muskelfasern hingegen entwickeln sich innerhalb der Basalmembran der zugrunde gegangenen Faser und sind daher von einer doppelten Basalmembran umgeben (Borisov et al., 2005).

Kern und Mitarbeiter untersuchten humane Biopsien nach Langzeitdenervation durch Rückenmarksläsion. Die Dauer der Denervation betrug dabei zwischen neun Monaten und 19 Jahren. Dabei konnten sie kleine Muskelfasern

nachweisen. Diese waren für embryonales MHC positiv, was darauf hinweist, dass es sich um unreife Fasern handelt. Die kleinen Muskelfasern machten 1,1% der Gesamtfasermenge aus, was deutlich unter der Menge an kleinen Fasern in unseren Biopsien liegt. Kern und Mitarbeiter fassten die kleinen Fasern als kürzlich regenerierende Fasern auf (Kern et al., 2004).

Da in der vorliegenden Arbeit Regeneration bei der Auswahl der untersuchten Biopsien ausgeschlossen wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass die in unseren Biopsien aufgetretenen kleinen Fasern ebenfalls das Resultat von durch Denervation bewirkten Myogenesevorgängen sind. Die Reaktivität mit Antikörpern gegen MHCn, NCAM und Myogenin (siehe Abbildungen 17 bis 21) unterstützt die Annahme, dass es sich hierbei um unreife Fasern handelt, die sich in der Myogenese befinden.

Schon 1994 fand auch Weis bei der immunhistochemischen Färbung mit Anti-MyoD1 und Anti-Myogenin positive Zellkerne, die zu kleinen Fasern gehörten. Er interpretierte diese Fasern als proliferierte Satellitenzellen, die Myotuben bilden oder als stark atrophierte Muskelfasern (Weis, 1994). Hierbei könnte es sich ebenfalls um aus Satellitenzellen im Rahmen der nach Denervation auftretenden Myogenese neu gebildete Fasern gehandelt haben.

Unklar bleibt, warum es signifikant mehr MHCn-positive als NCAM-positive und Myogenin-positive kleine Muskelfasern gibt ($p < 0,0001$). Da Myogenin im Zellkern exprimiert wird, könnte man mutmaßen, dass in den untersuchten Schnitten nicht alle Zellkerne getroffen wurden und so die tatsächliche Menge an Myogenin-positiven Fasern höher liegt. Doch erklärt dies allein nicht die große Differenz von durchschnittlich 82,0% (95%-KI: 78,0-86,1%) MHCn-positiven Fasern und 20,5% (KI: 12,3-28,6%) Myogenin-positiven Fasern. Wahrscheinlicher ist, dass die drei Marker in der Entwicklung unterschiedlich reguliert werden und es daher Zeitpunkte gibt, in denen nicht alle drei Marker zugleich exprimiert werden. Figarella-Branger und Mitarbeiter konnten feststellen, dass es in der Entwicklung von humaner Muskulatur des M. psoas und des M. quadriceps einen Zeitraum gibt, in dem NCAM herunterreguliert

wird, während MHCn und embryonales MHC noch exprimiert werden (Figarella-Branger et al., 1992).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach Denervation auftretende Myogenese in humanen Muskelbiopsien in einem beträchtlichen Ausmaß stattzufinden scheint und sich in der Bildung kleiner, größtenteils MHCn-positiver Muskelfasern präsentiert. In den letzten Jahren wurden im Tierversuch viele Gene nachgewiesen, die nach Langzeit- und Kurzzeitdenervation unterschiedlich aufreguliert werden (Kostrominova et al., 2005; Magnusson et al., 2005; Batt et al., 2006; Sacheck et al., 2007). Bei der Interpretation dieser molekulargenetischen Studien gilt es das nicht unerhebliche Maß an Myogenesevorgängen in denervierter Muskulatur zu beachten, auch bei zukünftigen molekulargenetischen Studien an menschlicher Muskulatur.

4.4 Normal große Fasern

In der Routinehistologie kann man den normal großen Fasern ihren Innervationszustand nicht ansehen. Nur durch immunhistochemische Färbungen kann Denervation nachgewiesen werden.

Bei Betrachtung der normal großen Fasern fällt auf, dass diese insgesamt für alle untersuchten Denervationsmarker weniger häufig positiv sind als die angulär-atrophen und die kleinen Fasern (Tabellen 3 bis 5 und 17 bis 19 und Tabelle 22). Für NCAM sind diese Fasern jedoch deutlich häufiger positiv als für MHCn oder Myogenin (Tabellen 17 bis 19).

Normal große Fasern in Biopsien mit neurogener Atrophie können nicht denervierte Fasern, frisch denervierte Fasern, die noch nicht atrophiert sind, oder reinnervierte Fasern, darstellen (Tews et al., 1994). Es ist in humanen Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie davon auszugehen, dass nicht alle Fasern einer Biopsie denerviert sind. Da die nicht denervierten Fasern normale Größe aufweisen, überrascht es nicht, dass Fasern von normaler Größe seltener Denervationsmarker exprimieren als angulär-atrophe Fasern, von denen alle denerviert sein müssen.

Einige normal große Fasern exprimieren NCAM, jedoch kein MHCn und kein Myogenin (Abbildung 13). Dies liegt wohl daran, dass NCAM nach Denervation früher exprimiert wird. Experimente an der Ratte haben gezeigt, dass NCAM ab dem zweiten Tag nach Denervation immunhistochemisch nachweisbar ist (Covault und Sanes, 1985), während MHCn mit der gleichen Methode an der Ratte erst nach drei Tagen nachgewiesen werden kann (Schiaffino et al., 1988) und Myogenin nach 2,5 Tagen (Weis, 1994). Unsere Ergebnisse bestätigen somit, dass NCAM früher nach Denervation exprimiert wird als MHCn und Myogenin, auch in humaner Muskulatur.

Es kommen auch einzelne Fasern vor, die MHCn exprimieren, jedoch kein NCAM. Dies lässt sich damit erklären, dass die Expression von NCAM nach Reinnervation sehr schnell zurückgeht (Covault und Sanes, 1985). Es gibt folglich einen Zeitraum, in dem reinnervierte Fasern ihre ursprüngliche normal große Form wieder erreicht haben, kein NCAM mehr exprimieren, jedoch noch MHCn.

Weniger NCAM-positive als MHCn-positive normal große Fasern in einer Biopsie deuten somit auf Reinnervation hin. Beim Vergleich solcher Biopsien mit der Gesamtheit aller Biopsien fällt auf, dass hier häufiger NCAM-negative angulär-atrophe Fasern vorliegen, welche man auch als Zeichen für Reinnervation betrachten kann. Desweiteren zeigen diese Biopsien häufiger ein „akutes“ Erscheinungsbild, d.h. die Biopsien ähneln bis auf das Vorliegen angulär-atropher Fasern normaler Muskulatur (Tabelle 20). Dies entspricht auch den Beobachtungen von Irintchev und Mitarbeitern und Tews und Mitarbeitern, die zeigen konnten, dass die durch Denervation in der Muskulatur hervorgerufenen morphologischen Veränderungen nach Reinnervation zurückgehen (Irintchev et al., 1990, Tews et al., 1994).

Mehr NCAM-positive als MHCn-positive normal große Fasern in einer Biopsie deuten hingegen auf frische Denervation hin, da NCAM früher exprimiert wird. Diese Gruppe an Biopsien weist in gleichem Maße „akute“ wie „chronische“ Fälle auf, was sich dadurch erklären lässt, dass frische Denervation sowohl im

Rahmen von längeren Denervationsvorgängen als auch akut auftreten kann (Tabelle 20).

Betrachtet man Biopsien mit vielen NCAM-positiven und vielen MHCn-positiven normal großen Fasern, so fällt auf, dass diese eher vom chronischen Typ sind und wenig NCAM-negative angulär-atrophe Fasern zeigen (Tabelle 20). Man kann das Vorliegen vieler NCAM-positiver normal großer Fasern als Hinweis für frische Denervation ansehen und das Vorliegen vieler MHCn-positiver normaler Fasern als Hinweis dafür, dass die Denervation nicht ganz akut ist. Tews und Mitarbeiter konnten an der Ratte feststellen, dass länger andauernde Denervationsvorgänge ohne Reinnervation zu zunehmenden morphologischen Veränderungen, wie Fibrose, Atrophie und Vorkommen von Fettzellen, führen (Tews et al., 1994). Das „chronische“ Bild dieser Biopsien kann man als Konsequenz hiervon ansehen.

Biopsien mit wenigen NCAM-positiven und wenigen MHCn-positiven normal großen Fasern, weisen häufig NCAM-negative angulär-atrophe Fasern auf und sind eher vom „akuten“ Typ (Tabelle 10). Für diese Biopsien könnte dasselbe zutreffen, wie für die Biopsien mit wenig NCAM-positiven und vielen MHCn-positiven normal großen Fasern, mit der Ausnahme, dass die Reinnervation hier schon etwas länger zurückliegt und daher die Menge der MHCn-positiven Fasern schon zurückgegangen ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass NCAM aufgrund der raschen Expression nach Denervation häufiger als die anderen Marker nach Denervation positiv ist. Die Expression von MHCn geht nach Reinnervation weniger rasch zurück als NCAM, was das Vorkommen von Fasern, die zwar MHCn exprimieren, jedoch NCAM-negativ sind, erklärt.

Betrachtet man die Menge der NCAM-positiven und MHCn-positiven normal großen Fasern in Kombination mit der Gesamtmorphologie der Biopsie unter Berücksichtigung und der Menge der NCAM-negativen angulär-atropen Fasern als Zeichen für Reinnervation, lassen sich Gruppen finden, welche unter

Umständen Aussagen über den Verlauf der Denervations- und Reinnervationsprozesse zulassen.

4.6 Tenascin

44 von 65 untersuchten Biopsien (entspricht 67,7%) zeigen Tenascin-positive Fasern (siehe 3.6.1). Tenascin unterscheidet sich dabei im Expressionsmuster von den anderen Denervationsmarkern (NCAM, MHCn, Myogenin): Die positiven Fasern sind hier nicht wie bei NCAM, MHCn und Myogenin gleichmäßig über den Schnitt verteilt. Stattdessen finden sich Felder, innerhalb denen alle Fasern positiv sind. Dabei sind nicht wie bei den anderen Denervationsmarkern bevorzugt angulär-atrophe Fasern oder kleine Fasern positiv, sondern alle Faserformen gleichermaßen (Abbildung 22). In Biopsien vom „chronischen“ Typ finden sich signifikant mehr Tenascin-positive Fasern (12,8%) als in „akuten“ Fällen (3,2%) ($p=0,0015$) (Tabelle 21).

In Versuchen an der mimischen Muskulatur von Ratten konnten Tews und Mitarbeiter nachweisen, dass Tenascin nach Denervation verstärkt in die Muskelfasern umgebenden Bindegewebe exprimiert wird (Tews et al., 1997). Dies entspricht auch unseren Ergebnissen: Tenascin wird in 67,7% der Biopsien mit neurogener Atrophie in der Extrazellulärmatrix exprimiert (siehe 3.6.1).

Schoser und Goebel untersuchten die Expression von Tenascin immunhistochemisch an humanen Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie und konnten feststellen, dass auch in humaner Muskulatur Tenascin nach Denervation ansteigt. Dabei konnten sie in 17 von 18 untersuchten Biopsien (entspricht 94,4%) Tenascin nachweisen (Schoser und Goebel, 1996). In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Biopsien war Tenascin hingegen nur in 44 von 65 Biopsien (entspricht 66,7%) positiv. Eine Erklärung hierfür könnte die geringe Anzahl von nur 18 Biopsien sein.

Insgesamt haben somit verschiedene Arbeiten gezeigt, dass Tenascin nach Denervation verstärkt in der Extrazellulärmatrix von Skelettmuskulatur exprimiert wird.

Es überrascht jedoch, dass Tenascin dabei nicht dem Expressionsmuster der anderen Denervationsmarker folgt: in den von uns untersuchten Biopsien wies Tenascin eine felderförmige Verteilung der positiven Fasern auf (Abbildung 22). Die diffuse Verteilung der für die anderen Marker positiven Fasern und der angulär-atrophischen Fasern über die ganze Schnittfläche zeigt jedoch, dass sich die denervierten Fasern in Biopsien mit neurogener Atrophie auf den ganzen Schnitt verteilen.

Anhand dieser Überlegungen ist davon auszugehen, dass nicht speziell denervierte Fasern Tenascin positiv sind. Die Beobachtung, dass angulär-atrophische Fasern, die ja als einzige Faserform als sicher denerviert gelten, nicht häufiger Tenascin-positiv sind als normal große Fasern, stützt diesen Verdacht. Es stellt sich daher die Frage, ob Tenascin überhaupt als Marker für Denervation angesehen werden kann.

Verschiedene Arbeiten konnten nachweisen, dass Tenascin vermehrt nach Denervation exprimiert wird (Schoser und Goebel, 1996, Tews et al., 1997). Connor und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass die Akkumulation von Tenascin tatsächlich mit Denervation und nicht mit Muskelinaktivität zu tun hat (Connor et al., 1994). Doch ist die Expression von Tenascin nicht spezifisch für Denervation. Verschiedene Arbeiten beschreiben eine ebenfalls felderförmige extrazelluläre Expression von Tenascin bei Muskeldystrophie vom Typ Becker und vom Typ Duchenne, bei kongenitaler Muskeldystrophie und bei Dermatomyositis und Polymyositis (Settles et al., 1996; Gullberg et al., 1997; Müller-Felber et al., 1998; Ringelmann et al., 1999). Dabei korreliert die Immunreaktivität für Tenascin mit dem Vorkommen von Makrophagen (Gullberg et al., 1997).

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Tenascin nach Denervation aufreguliert wird.

Die Denervationsmarker NCAM, Myogenin und MHCn zeichnen sich durch Expression während der Entwicklung der Skelettmuskulatur aus. Auch Tenascin-X wird in fetaler Muskulatur exprimiert (Erickson, 1993). Außerdem

gibt es auch für Tenascin-C Hinweise, dass es eine Rolle bei Innervationsvorgängen spielt: So zeigen Tenascin-C-defiziente Mäuse eine abnormale Reinnervation (Cifuentes-Diaz et al., 2002) und Antikörper gegen Tenascin können eine Reinnervation signifikant verzögern (Langenfeld-Oster et al., 1994). Dies legt nahe, dass Tenascin nach Denervation aufreguliert wird und eine Rolle bei der Reinnervation spielt. Passend dazu konnten verschiedene Arbeiten nach Denervation eine vermehrte Expression von Tenascin an motorischen Endplatten nachweisen (Sanes et al., 1986; Irintchev et al., 1993).

Die Verteilung der positiven Fasern in den von uns untersuchten Biopsien in Feldern ohne vermehrte Expression in angulär-atrophen Fasern (Abbildung 17), schließt jedoch aus, dass Tenascin hier nur von denervierten Fasern exprimiert wird.

Gatchalian und Mitarbeiter konnten 1989 feststellen, dass Tenascin in denervierten Fasern durch Fibroblasten produziert wird. Diese Fibroblasten fanden sich vorwiegend in perisynaptischen Regionen, doch auch Fibroblasten aus synapsen-freien Regionen von denervierter Muskulatur konnten in Kultur Tenascin akkumulieren (Gatchalian et al., 1989). Die Produktion von Tenascin durch Fibroblasten bietet eine plausible Erklärung, weshalb Tenascin in der vorliegenden Arbeit vermehrt in Biopsien mit „chronischem“ Erscheinungsbild, d.h. mit vielen Allgemeinveränderungen, wie Fibrose, exprimiert wird.

Im Laufe der Denervation könnten Fibroblasten von perisynaptischen Regionen ausgehend Tenascin produzieren, welches sich mit zunehmender Akkumulation felderförmig in der Extrazellulärmatrix verteilen könnte. Auch eine Tenascinproduktion in Regionen ohne Synapsen wäre nach Denervation über einen längeren Zeitraum denkbar. Die Produktion von Tenascin durch Fibroblasten erklärt, weshalb die Tenascin-positive Extrazellulärmatrix in unseren Biopsien nicht speziell denervierten Fasern zugeordnet werden kann, sondern sich über die an denervierte Fasern grenzenden Bereiche hinaus felderförmig ausbreitet.

Es gilt als erwiesen, dass Tenascin ein Molekül ist, welches in adulten Geweben exprimiert wird, in denen Umbauprozesse, wie Wundheilung, Neovaskularisierung oder Entzündung, ablaufen (Koukoulis et al., 1991; Whitby and Ferguson, 1991; Whitby et al., 1991; Erickson, 1993; Hsia und Schwarzbauer, 2005). Die Expression von Tenascin nach Denervation könnten daher ebenfalls auf Umbauprozessen beruhen. Denervation kann in der Muskulatur Umbauprozesse, wie beispielweise Fibrose und die Proliferation von Fibroblasten, welche Tenascin produzieren können, bewirken (Murray und Robbins, 1982; Viguie et al., 1997; Ashley et al., 2007). Umbauprozesse nach Denervation sind Grundlage für die morphologischen Veränderungen, aufgrund derer die Biopsien in die Kategorien „akut“ und „chronisch“ eingeordnet wurden (siehe 3.1 und Abbildungen 11 und 12). Es ist daher nicht verwunderlich, dass „chronische“ Biopsien signifikant mehr Tenascin exprimieren (Tabelle 21).

Insgesamt kann man sagen, dass Tenascin zwar nach Denervation vermehrt exprimiert wird, jedoch nicht wie die anderen Denervationsmarker einzelne denervierte Fasern markiert, sondern eher Felder mit positiven Fasern. Dies ist wohl eher als allgemeine Reaktion der Skelettmuskulatur auf Denervation anzusehen, und weniger als Zeichen, dass speziell die angrenzende Faser denerviert sein muss. Daher weisen „chronische“ Biopsien, die viele Allgemeinveränderungen aufweisen, mehr Tenascin auf, als „akute“ Biopsien, die morphologisch eher normaler Muskulatur ähneln.

4.7 Vergleich mit den Ergebnissen früherer Versuche an humanen Muskelbiopsien

Viele Arbeiten in der Vergangenheit haben sich mit der Expression der Denervationsmarker NCAM, Myogenin und MHCn in humanen Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie beschäftigt. Doch wurde hierbei immer nur der Anteil an positiven Fasern bezogen auf die Gesamtzahl der Muskelfasern ermittelt. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden die Muskelfasern erstmal hinsichtlich

ihrer Form und Größe in Kategorien eingeteilt und mit der Kategorie „angulär-atrophe Fasern“ ausschließlich sicher denervierte Fasern untersucht.

Aus Arbeiten in der Vergangenheit ist bekannt, dass in Biopsien mit neurogener Atrophie, die meisten Fasern kein NCAM exprimieren. Bei Illa und Mitarbeiter waren unter 20% aller Fasern NCAM-positiv (Illa et al., 1992), bei Winter und Bornemann 11,9% (Winter und Bornemann, 1999). Doch beziehen sich diese Angaben auf alle Muskelfasern einer Biopsie, nicht nur auf die angulär-atropen Fasern. Dadurch lassen sich diese Daten nicht direkt mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichen. Grob geschätzt dürften sich diese jedoch in etwa entsprechen (vergleiche Tabelle 22).

Die durch die separate Auszählung der Fasern der Kategorie „angulär-atrophe“ ermittelte große Menge an NCAM-negativen angulär-atropen Fasern in den meisten Biopsien legt nahe, dass Reinnervation in humaner Skelettmuskulatur nach Motoneuronenerkrankungen oder Polyneuropathie in weitaus größerem Maße stattfindet als bisher angenommen und durch das Vorliegen dieser negativen Fasern immunhistochemisch nachgewiesen werden kann.

Die Menge der MHCn- und NCAM-positiven angulär-atropen Fasern unterscheidet sich in den von uns untersuchten Biopsien nicht signifikant ($p=0,28$). Winter und Bornemann untersuchten 1999 ähnliche Biopsien, ermittelten jedoch einen Wert für alle Muskelfasern, nicht nur für angulär-atrophe Fasern. Dabei lag die Menge der NCAM-positiven-Fasern mit 11,9% über der Menge der MHCn-positiven Fasern mit 5,3% (Winter und Bornemann, 1999). Direkt vergleichen kann man diese Werte mit den Ergebnissen dieser Arbeit jedoch ebenfalls nicht, da sie sich nicht auf angulär-atrophe Fasern beziehen, sondern auf alle Fasern einer Biopsie. Berücksichtigt man, dass in der vorliegenden Arbeit normal große Fasern deutlich häufiger NCAM als MHCn exprimierten und Biopsien mit neurogener Atrophie zu einem Großteil aus normal großen Fasern bestehen, wird klar, wodurch der Unterschied zustande kommt.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit etwa die gleiche Menge an NCAM- und MHCn-positiven Fasern wie Arbeiten in der Vergangenheit zeigen. Im Gegensatz zu diesen wurde hier jedoch die Menge an positiven Fasern für angulär-atrophe Fasern als separate Kategorie ermittelt. Überraschenderweise zeigt sich hierbei eine große Menge an NCAM- und/ oder MHCn-negativen angulär-atropen Fasern (Tabellen 3 bis 5 und Abbildung 13).

5. Zusammenfassung

Denervation von Muskulatur führt zu neurogener Atrophie. Diese geht mit morphologischen Veränderungen, wie dem Auftreten von angulär-atropen Fasern, einher und führt zur Expression von Denervationsmarkern, wie NCAM, MHCn, Myogenin und Tenascin.

In humanen Muskelbiopsien liegt ein heterogenes Muster an Fasern vor. Im Gegensatz zur Denervation im Tierexperiment kann nicht direkt auf den Innervationszustand geschlossen werden. Stattdessen liegen in humanen Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie denervierte, reinnervierte und normale Fasern nebeneinander vor.

In der Literatur wurden zwar sowohl morphologische Veränderungen beschrieben, die auf Denervation einer Faser hinweisen, als auch einige Denervationsmarker, die nach Denervation aufreguliert werden. Doch wurden bisher weder mehrere Denervationsmarker im Zusammenhang, noch der Zusammenhang zwischen der Expression von Denervationsmarkern und dem Vorliegen von morphologischen Veränderungen, wie Atrophie untersucht, so dass es momentan noch nicht möglich ist, genaue Aussagen über den Innervationszustand von Muskelfasern in humanen Muskelbiopsien zu treffen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, durch vergleichende Untersuchung mehrerer Denervationsmarker (NCAM, MHCn, Myogenin und Tenascin) und durch Vergleich der Expression dieser Marker in Fasern mit verschiedenem Ausmaß an Atrophie eine genauere Aussage über Denervation und Reinnervation in einer humanen Muskelbiopsie zu treffen, als dies anhand der bisherigen Erkenntnisse möglich war.

Es wurden dabei 66 humane Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie immunhistochemisch auf ihre Reaktivität mit Anti-NCAM, Anti-MHCn, Anti-Myogenin und Anti-Tenascin überprüft. Um speziell die Expression dieser Marker nach Denervation zu untersuchen, wurden Biopsien die für Vimentin, einem regenerationsspezifischen Marker, positiv waren, ausgeschlossen.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zur Morphologie der Fasern wurden die Muskelfasern in die Kategorien „normal groß“, „angulär-atroph“ und „klein“ eingeteilt. Die Menge der positiven Fasern wurde getrennt für diese drei Kategorien ermittelt.

Überraschend war das Vorliegen einer großen Menge an kleinen Fasern, was für humane Muskelbiopsien so bisher nie beschrieben worden war. Diese kleinen Muskelfasern sind signifikant häufiger MHCn-positiv als NCAM- oder Myogenin-positiv ($p < 0,0001$). Entstanden sind diese Muskelfasern vermutlich im Rahmen von durch Denervation ausgelösten Myogenesevorgängen mittels Aktivierung und Fusion von Satellitenzellen. Myogenese spielt demnach in denervierter humaner Muskulatur eine weitaus größere Rolle als bisher angenommen.

Angulär-atrophe Fasern waren insgesamt ähnlich häufig für NCAM und MHCn positiv ($p = 0,28$). Erstaunlicherweise unterschied sich die Menge der NCAM- und MHCn-positiven Fasern in den einzelnen Biopsien jedoch häufig. Dies deutet darauf hin, dass NCAM und MHCn zeitlich nicht exakt dem gleichen Expressionsmuster folgen.

Einige angulär-atrophe Fasern sind MHCn-positiv, jedoch NCAM-negativ. Dies liegt vermutlich daran, dass die Expression von NCAM, wie in der Literatur beschrieben, nach Reinnervation sehr rasch zurückgeht.

Normal große Fasern waren häufiger NCAM-positiv als MHCn- oder Myogenin-positiv. Dies entspricht den Erwartungen, da NCAM auch im Tierexperiment früher als MHCn oder Myogenin exprimiert wird.

Auffällig war jedoch das Vorliegen von erstaunlich vielen NCAM- und MHCn-negativen angulär-atropen Fasern. Dies kann nur durch Reinnervation erklärt werden. Reinnervation liegt demnach in humanen Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie überraschend häufig vor.

Myogenin-positive Fasern waren erstaunlicherweise nur in wenigen Biopsien zu finden. Wenn Myogenin-positive Fasern vorlagen, dann handelte es sich vor allem um angulär-atrophe und kleine Fasern.

Ebenfalls erstaunlich war das Expressionsmuster von Tenascin: Tenascin unterschied sich von den anderen Denervationsmarkern dahingehend, dass es eher Felder von positiven Fasern bildete, anstatt einzelne Fasern anzufärben und von allen Faserformen ähnlich häufig exprimiert wurde. Tenascin korreliert dabei eher mit dem Ausmaß an Atrophie insgesamt ohne speziell von denervierten Fasern exprimiert zu werden und kann daher nicht als spezifischer Denervationsmarker angesehen werden.

NCAM und MHCn stellen demnach brauchbare Denervationsmarker dar und lassen bei kombinierter Anwendung gute Schlüsse auf das Vorliegen von Denervation und Reinnervation in humanen Muskelbiopsien zu.

Myogenin und Tenascin sind als Denervationsmarker nicht empfehlenswert. Myogenin wird nur von einem geringen Teil der denervierten Fasern exprimiert, während Tenascin überhaupt nicht dem Muster der anderen Denervationsmarker folgt und eher ein Marker für pathologische Veränderungen im Allgemeinen als speziell für Denervation zu sein scheint. Die Bezeichnung als Denervationsmarker ist bei Tenascin daher in Frage zu stellen.

Das Vorkommen einer großen Menge an kleinen Fasern zeigt, dass Myogenesevorgänge in humanen Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie in überraschend großem Maße ablaufen und erweitert die ohnehin schon hohe Komplexität von neurogener Atrophie um einen weiteren wichtigen Aspekt.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, L., Carlson, B.M., 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
- Adihetty, P. J., O'Leary, M.F.N., Chabi, B., Wicks, K.L., Hood, D. A. (2007)
Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle
J. Appl.Physiol.,102,1143-1151
- Agbulut, O., Noirez, P., Beaumont, F., Butler-Browne, G. (2003)
Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice
Biol. Cell, 95, 399-406
- Al-Amood, W.S., Lewis, D.M. (1989)
A comparison of the effects of denervation on the mechanical properties of rat
and guinea-pig skeletal muscle
J. Physiol., 414, 1-16
- Al-Amood, W.S., Lewis, D.M., Schmalbruch, H. (1991)
Effects of chronic electrical stimulation on contractile properties of long-term
denervated rat skeletal muscle
J. Physiol., 441, 243-256
- Angelov, D.N., Walther, M., Streppel, M., Guntinas-Lichius, O., Neiss, W.F.,
Probstmeier, R., Pesheva, P. (1998)
Tenascin-R is antiadhesive for activated microglia that induce downregulation of
the protein after peripheral nerve injury: a new role in neuronal protection
J. Neurosci., 18, 6218-6229
- Anzil, A.P., Wernig, A. (1989)
Muscle fibre loss and reinnervation after long-term denervation
J. Neurocytol., 18, 833-845

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

Origin of satellite cells in avian skeletal muscles

Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp., 72, 163-181

Arndt, I., Pepe, F.A. (1975)

Antigenic specificity of red and white muscle myosin

J. Histochem. Cytochem., 23, 159-168

Ashley, Z., Sutherland, H., Lanmüller, H., Russold, M.F., Unger, E., Bijak, M.,

Mayr, W., Boncompagni, S., Protasi, F., Salmons, S., Jarvis, J.C. (2007)

Atrophie, but not necrosis in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year

Am. J. Physiol. Cell Physiol., 292, C440-C451

Atkins, A.R., Gallin, W.J., Owens, G.C., Edelman, G.M., Cunningham, B.A.

(2004)

Neural cell adhesion molecule (N-CAM) homophilic binding mediated by the two N-terminal Ig domains is influenced by intramolecular domain-domain interactions J. Biol. Chem., 279, 49633-49643

Baldwin, T.J., Burden, S.J. (1989)

Muscle-specific gene expression controlled by a regulatory element lacking a MyoD1-binding site

Nature, 341(6244)716-720

Bandman, E., Matsuda, R., Micou-Eastwood, J., Strohman, R. (1981)

In vitro translation of RNA from embryonic and from adult chicken pectoralis muscle produces different myosin heavy chains

FEBS Lett., 136, 301-305

Bandman, E., Matsuda, R., Strohman, R. (1982)

Developmental appearance of myosin heavy and light chain isoforms in vivo and in vitro in chicken skeletal muscle

Dev. Biol., 93, 508-518

Bandman, E., Bennett, T. (1988)

Diversity of fast myosin heavy chain expression during development of gastrocnemius, biceps brachii, and posterior latissimus dorsi muscles in normal and dystrophic chickens

Dev. Biol., 130, 220-231

Banker, B.Q., Engel, A.G. (2004)

Basic reactions of muscle, 691-747 in : Engel, A.G., Franzini-Armstrong, C.F.: Myology; 3. Auflage McGraw-Hill, New York, Chicago, San Francisco, Lisbon, London, Madrid, Mexico City, Milan, New Delhi, San Juan, Seoul, Singapore, Sydney, Toronto

Barton, C.H., Dickson, G., Gower, H.J., Rowett, L.H., Putt, W., Elsom, V., Moore, S.E., Goidis, C., Walsh, F.S. (1988)

Complete sequence and in vitro expression of a tissue-specific phosphatidylinositol-linked N-CAM isoform from skeletal muscle

Development, 104, 165-173

Batt, J., Bain, J., Goncalves, J., Michalski, B., Plant, P., Fahnestock, M., Woodgett, J. (2006)

Differential gene expression profiling of short and long term denervated muscle
FASEB J., 20, 115-117

Baumgartner, S., Chiquet-Ehrismann, R. (1993)

Ten^a, a Drosophila gene related to tenascin, shows selective transcript localization
Mech. Dev., 40, 165-176

Becker, C.G., Schweitzer, J., Feldner, J., Schachner, M., Becker, T. (2004)

Tenascin-R as a repellent guidance molecule for newly growing and regenerating optic axons in adult zebrafish

Mol. Cell. Neurosci., 26(3), 376-389

Bessereau, J.L., Stratford-Perricaudet, L.D., Piette, J., Le Poupon, C.,
Changeux, J.P. (1994)

In vivo and in vitro analysis of electrical activity-dependent expression of muscle
acetylcholine receptor genes using adenovirus

Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 1304-1308

Bischoff, R. (1975)

Regeneration of single skeletal muscle fibers in vitro

Anat. Rec., 182, 215-235

Bischoff, R., Franzini-Armstrong, C. (2004)

Satellite and stem cells in muscle regeneration, 66-86 in : Engel, A.G., Franzini-
Armstrong, C.F.: Myology; 3. Auflage McGraw-Hill, New York, Chicago, San
Francisco, Lisbon, London, Madrid, Mexico City, Milan, New Delhi, San Juan,
Seoul, Singapore, Sydney, Toronto

Biral, D., Damiani, E., Margreth, A., Scarpini, E. (1984)

Myosin subunit composition in human developing muscle

Biochem. J., 224, 923-931

Böcker, W., Denk, Heitz, P.U. (Hrsg.) (2004)

Pathologie, 3. Auflage, Elsevier, München

Boenisch, T. (Hrsg.) (2001)

Färbemethoden – Detektionssysteme, Antikörper, Grundlagen der
Immunchemie, Grundlagen der Enzymatik; in: Dako, Handbuch
immunchemische Färbemethoden, 3. Auflage; DakoCytomation, Carpinteria,
California, USA

Borisov, A.B., Huan, S.K., Carlson, B.M. (2000a)

Remodeling of the vascular bed and and progressive loss of capillaries in
denervated skeletal muscle

Anat. Rec., 258, 292-304

Borisov, A.B., Carlson, B.M. (2000b)

Cell death in denervated skeletal muscle is distinct from classical apoptosis

Anat. Rec., 258, 305-318

Borisov, A.B., Dedkov, E.I., Carlson, B.M. (2001)

Interrelations of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle

Anat. Rec., 264, 203-218

Borisov, A.B., Dedkov, E.I., Carlson, B.M. (2005)

Abortive myogenesis in denervated skeletal muscle: differentiative properties of satellite cells, their migration, and block of terminal differentiation

Anat. Embryol., 209, 269-279

Bornemann, A., Schmalbruch, H. (1992)

Desmin and Vimentin in regenerating muscles

Muscle Nerve, 15, 14-20

Braun, T., Rudnicki, M.A., Arnold, H.H., Jaenisch, R. (1992)

Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death

Cell, 71, 369-382

Bristow, J., Carey, W., Egging, D., Schalkwijk, J. (2005)

Tenascin-X, collagen, elastin, and the Ehlers-Danlos syndrome

Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet., 139, 24-30

Brown, M.C., Ironton, R. (1978)

Sprouting and regression of neuromuscular synapses in partially denervated mammalian muscles

J. Physiol., 278, 325-348

Brushart, T.M.E. (1988)

Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons

J. Neurosci., 18, 1026-1031

- Brushart, T.M.E., Gerber, J., Kessens, P., Chen, Y.G., Royall, R.M. (1998)
Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation
J. Neurosci., 18, 8674-8681
- Brussee, V., Cunningham, F.A., Zochodne, D.W. (2004)
Direct insulin signaling of neurons reverses diabetic neuropathy
Diabetes, 53, 1824-1830
- Buckingham, M. (1992)
Making muscle in mammals
Trends Genet., 8, 144-149
- Buckingham, M. (2001)
Skeletal muscle formation in vertebrates
Current Opinion Genet. Dev., 11, 440-448
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S.,
Montarras, D., Rocancourt, D., Relaix, F. (2003)
The formation of skeletal muscle: from somite to limb
J. Anat., 202, 59-68
- Buonanno, A., Apone, L., Morasso, M.I., Beers, R., Brenner, H.R., Eftimie, R.
(1992)
The MyoD family of myogenic factors is regulated by electric activity: isolation
and characterization of a mouse Myf-5 cDNA
Nucleic Acids Res., 20, 539-544
- Buonanno, A., Edmondson, D.G., Hayes, W.P. (1993)
Upstream sequences of the Myogenin gene convey responsiveness to skeletal
muscle denervation in transgenic mice
Nucleic Acids Res., 21, 5684-5693
- Butler-Browne, G.S., Bugaisky, L.B., Cuénoud, S., Schwartz, K., Whalen, R.G.
(1982)
Denervation of newborn rat muscles does not block the appearance of adult fast

myosin heavy chain

Nature, 299, 830-833

Caiozzo, V.J., Wu, Y.Z., Baker, M.J., Crumley, R. (2004)

Effects of denervation on cell cycle control in laryngeal muscle

Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., 130, 1056-1068

Carlson, B.M., Borisov, A.B., Dedkov, E.I., Khalyfa, A., Kostrominova, T.Y.,

Macpherson, P.C.D., Wang, E., Faulkner, J.A. (2002)

Effects of long-term denervation on skeletal muscle in old rats

J. Gerontol., 57A, B366-B374

Carraro, U., Morale, D., Mussini, I., Lucke, S., Cantini, M., Betto, R., Catani, C.,

Dalla Libera, L., Danieli Betto, D., 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, N.R., Covault, J., Wollman, R.L., Sanes, J.R. (1987)

Neural Cell Adhesion Molecule in normal, denervated, and myopathic human muscle

Ann. Neurol., 21, 481-489

Cerny, L.C., Bandman, E. (1987)

Expression of myosin heavy chain isoforms in regenerating myotubes of innervated and denervated chicken pectoral muscle

Dev. Biol., 119, 350-362

Chargé, S.B.P., Rudnicki, M.A. (2004)

Cellular and molecular regulation of muscle regeneration

Physiol. Rev., 84, 209-238

Chen, S.P., Sheu, J.R., Lin, A.C.M., Hsiao, G., Fong, T.H. (2005)

Decline in titin content in rat skeletal muscle after denervation

Muscle Nerve, 32, 798-807

Chiquet-Ehrismann, R., Chiquet, M. (2003)

Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress

J. Pathol, 200, 488-499

Christ, B., Jacob, H.J., Jacob, M. (1977)

Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos

Anat. Embryol., 150, 171-186

Christ, B., Ordahl, C.P. (1995)

Early stages of chick somite development

Anat. Embryol., 191, 381-396

Clegg, C.H., Linkhart, T.A., Olwin, B.B., Hauschka, S.D. (1987)

Growth factor control of skeletal muscle differentiation: commitment to terminal differentiation occurs in G1 phase and is repressed by fibroblast growth factor

J. Cell Biol., 105, 949-956

Connor, E.A., Qin, K., Yankelev, H., DeStefano, D. (1994)

Synaptic activity and connective tissue remodeling in denervated frog muscle

J. Cell Biol., 127, 1435-1445

Cooper, R.N., Tajbakhsh, S., Mouly, V., Cossu, G., Buckingham, M., Butler-Browne, G.S. (1999)

In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle

J. Cell Sci., 112, 2895-2901

Covault, J., Sanes, J.R. (1985)

Neural cell adhesion molecule (N-CAM) accumulates in denervated and paralyzed skeletal muscles

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4544-4548

Covault, J., Sanes, J.R. (1986a)

Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle

J. Cell Biol., 102, 716-730

Covault, J., Merlie, J.P., Goridis, C., Sanes, J.R. (1986b)

Molecular forms of N-CAM and its RNA in developing and denervated skeletal muscle

J. Cell Biol., 102, 731-739

Cunningham, B.A., Hoffman, S., Rutishauser, U., Hemperly, J.J., Edelman, G.E. (1983)

Molecular topography of the neural cell adhesion molecule N-CAM: surface orientation and location of sialic acid-rich and binding regions

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 80, 3116-3120

Cunningham, B.A., Hemperly, J.J., Murray, B.A., Prediger, E.A., Brackenbury, R., Edelman, G.M. (1987)

Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing

Science, 236(4803), 799-806

D'Albis, A., Pantaloni, C., Bechet, J.J. (1979)

An electrophoretic study of native myosin isozymes and of their subunit content

Eur. J. Biochem., 99, 261-272

D'Albis, A., Couteaux, R., Janmot, C., Roulet, A., Mira, J.C. (1988)

Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. Myosin isoform analysis.

Eur. J. Biochem., 174, 103-110

D'Albis, A., Couteaux, R., Mira, J.C. (1989)

Myosin isoforms transitions in regeneration of fast and slow muscles during postnatal development of the rat

Dev. Biol., 135, 320-325

Daniloff, J.K., Levi, G., Grumet, M., Rieger, F., Edelman, G.M. (1986)

Altered expression of neural cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair

J. Cell Biol., 103, 929-945

Davis, R.L., Weintraub, H., Lassar, A.B. (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-De
Angelis, M.G., 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 Castro Rodrigues, A., Andreo, J.C., Perezin de Matto Rodrigues, S. (2006)

Myonuclei and satellite cells in denervated rat muscles: an electron microscopy
study *Microsurgery*, 26, 396-398

Dedkov, E.I., Kostrominova, T.Y., Borisov, A.B., Carlson, B.M. (2001)

Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats
results in a reduction of the satellite cell population

Anat. Rec., 263, 139-154

Dhawan, J., Rando, T.A. (2005)

Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell
quiescence, activation and replenishment

Trends Cell Biol., 15, 666-673

Dias, P., Parham, D.M., Shapiro, D.N., Webber, B.L., Houghton, P.J. (1990)

Myogenic regulatory protein (MyoD1) expression in childhood solid tumors:
Diagnostic utility in rhabdomyosarcoma

Am. J. Pathol., 137, 1283-1291

Dias, P., Parham, D.M., Shapiro, S.N., Tapscott, S.J., Houghton, P.J. (1992)

Monoclonal antibodies to the myogenic regulatory protein MyoD1: epitope
mapping and diagnostic utility

Cancer Res., 52, 6431-6439

Dickson, G., Gower, H.J., Barton, C.H., Prentice, H.M., Elsom, V.L., Moore, S.E., Cox, R.D., Quinn, C., Putt, W., Walsh, F.S. (1987)

Human muscle neural cell adhesion molecule (N-CAM): Identification of a muscle-specific sequence in the extracellular domain

Cell, 50, 1119-1130

Dias, P., Parham, D.M., Shapiro, D.N., Tapscott, S.J., Houghton, P.J. (1992)

Monoclonal antibodies to the myogenic regulatory protein MyoD1: epitope mapping and diagnostic utility

Cancer Res., 52, 6431-6439

Dietrich, S., Abou-Rebyeh, F., Brohmann, H., Bladt, F., Sonnenberg-

Riethmacher, E., Yamaai, T., Lumsden, A., Brand-Saberi, B., Birchmeier, C.

(1999)

The role of SF/HGF and c-met in the development of skeletal muscle

Development, 126, 1621-1629

Dubowitz, V. (1985)

Muscle Biopsy: A practical approach. Second Edition.

Baillière Tindall, London

Duclert, A., Piette, J., Changeux, J.P. (1991)

Influence of innervations of myogenic factors and acetylcholine receptor α -subunit mRNAs

Neuroreport, 2, 25-28

Dulhunty, A.F. (1985)

Excitation-contraction coupling and contractile properties in denervated rat EDL and soleus muscles

J. Muscle Res. Cell Motil., 6, 207-225

Ecob-Prince, M., Hill, M., Brown, W. (1989)

Myosin heavy chain expression in human muscle cocultured with mouse spinal cord

J. Neurol. Sci., 90, 167-177

Edelman, G. M. (1984)

Modulation of cell adhesion during induction, histogenesis, and perinatal development of the nervous system.

Ann. Rev. Neurosci., 7, 339-377

Edelman, G. M. (1986)

Cell Adhesion Molecules in Neural Histogenesis

Ann. Rev. Physiol., 48, 417-430

Edmondson, D.G., Olson, E.N. (1989)

A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program Genes Dev., 3(5), 628-640

Edmondson, D.G., Olson, E.N. (1993)

Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription J. Biol. Chem., 268(2), 755-758

Eftimie, R., Brenner, H.R., Buonanno, A. (1991)

Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity

Proc. Natl. Sci., USA, 88, 1349-1353

Engel, A.G., Biesecker, G. (1982)

Complement activation in muscle fiber necrosis: demonstration of the membrane attack complex of complement in necrotic fibers

Ann. Neurol., 12, 289-296

Erickson, H.P. (1993)

Tenascin-C, Tenascin-R, Tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions

Curr. Opin. Cell Biol., 5, 869-876

Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., Mavilio, F. (1998)

Muscle regeneration by bone-marrow derived myogenic progenitors
Science, 279, 1528-1530

Figarella-Branger, D., Nedelec, J., Pellissier, J.F., Boucraut, J., Bianco, N., Rougon, G. (1990)

Expression of various isoforms of neural cell adhesive molecules and their highly polysialylated counterparts in diseased human muscles
J. Neurol. Sci., 98, 21-36

Figarella-Branger, D., Pellissier, J.F., Bianco, N., Pons, F., Leger, J.J., Rougon, G. (1992)

Expression of various NCAM isoforms in human embryonic muscles: Correlation with myosin heavy chain phenotypes
Neuropathol. Exp. Neurol., 51, 12-23

Finne, J., Finne, U., Deagostini-Bazin, H., Goridis, C. (1983)

Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule
Biochem. Biophys. Res. Commun., 112, 482-487

Finol, H.J., Lewis, D.M., Owens, R. (1981)

The effect of denervation on the contractile properties of rat skeletal muscle
J. Physiol., 319, 81-93

Fitzsimons, R.B., Hoh, J.F.Y. (1981a)

Embryonic and foetal myosins in human skeletal muscle
J. Neurol. Sci., 52, 367-384

Fitzsimons, R.B., Hoh, J.F.Y. (1981b)

Isomyosins in human type 1 and type 2 skeletal muscle fibres
Biochem. J., 193, 229-233

Florini, J.R. (1987)

Hormonal control of muscle growth
Muscle Nerve, 10, 577-598

Florini, J.R., Magri, K.A. (1989)

Effects of growth factors on myogenic differentiation

Am. J. Physiol., 256, C701-C711

Folpe, A.L. (2002)

MyoD1 and Myogenin expression in human neoplasia: a review and update

Adv. Anat. Pathol., 9, 198-203

Forsberg, E., Hirsch, E., Fröhlich, L., Meyer, M., Ekblom, P., Aszodi, A.,

Werner, S., Fässler, R. (1996)

Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking Tenascin-C

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 6594-6599

Fredette, B.J., Rutishauser, U., Landmesser, L. (1993)

Regulation and activity-dependence of N-Cadherin, N-CAM isoforms, and polysialic acid on chick myotubes during development

J. Cell Biol., 123, 1876-1888

Freitag, S., Schachner, M., Morellini, F. (2003)

Behavioral alterations in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R

Behav. Brain Res., 145, 189-207

Fu, S.Y., Gordon, T. (1995a)

Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy

J. Neurosci., 15, 3876-3885

Fu, S.Y., Gordon, T. (1995b)

Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation

J. Neurosci., 15, 3886-3895

Funk, W.D., Wright, W.E. (1992)

Cyclic amplification and selection of targets for multicomponent complexes: Myogenin interacts with factors recognizing binding sites for basic helix-loop-helix, nuclear factor 1, myocyte-specific enhancer-binding factor 2, and COMP1 factor

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 9484-9488

Gambke, B., Lyons, G.E., Haselgrove, J., Kelly, A.M., Rubinstein, N.A. (1983)

Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles

FEBS Lett., 156, 335-339

Gambke, B., Rubinstein, N.A. (1984)

A monoclonal antibody to the embryonic myosin heavy chain of rat skeletal muscle J. Biol. Chem., 259, 12092-12100

Gatchalian, C.L., Schachner, M., Sanes, J.R. (1989)

Fibroblasts that proliferate near denervated synaptic sites in skeletal muscle synthesize the adhesive molecules Tenascin (J1), N-CAM, fibronectin, and a heparan sulfate proteoglycan

J. Cell Biol., 108, 1873-1890

Gauthier, G.F., Dunn, R.A. (1973)

Ultrastructural and cytochemical features of mammalian skeletal muscle fibres following denervation

J. Cell Sci., 12, 525-547

Gennarini, G., Rougon, G., Deagostini-Bazin, H., Hirn, M., Goridis, C. (1984a)

Studies on the transmembrane disposition of the neural cell adhesion molecule N-CAM. A monoclonal antibody recognizing a cytoplasmic domain and evidence for the presence of phosphoserine residues.

Eur. J. Biochem., 142(1), 57-64

- Gennarini, G., Hirn, M., Deagostini-Bazin, H., Goridis, C.(1984b)
Studies on the transmembrane disposition of the neural cell adhesion molecule N-CAM. The use of liposome-inserted radioiodinated N-CAM to study its transbilayer orientation.
Eur. J. Biochem., 142(1), 65-73
- Germinario, E., Esposito, A., Megighian, A., Midrio, M., Biral, D., Betto, R., Danieli-Betto, D. (2002)
Early changes of type 2B fibers after denervation of rat EDL skeletal muscle
J. Appl. Physiol., 92, 2045-2052
- Glazner, G.W., Ishii, D.N. (1995)
Insulinlike growth factor gene expression in rat muscle during reinnervation
Muscle Nerve, 18, 1433-1442
- Gramsbergen, A., Ijckema-Paassen, J., Meek, M.F. (2000)
Sciatic nerve transection in the adult rat: abnormal EMG patterns during locomotion by aberrant innervations of hindleg muscles
Exp. Neurol., 161, 183-193
- Gros, J., Manceau, M., Thome, V., Marcelle, C. (2005)
A common somatic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells
Nature, 435, 954-958
- Grounds, M.D. (1987)
Phagocytosis of necrotic muscle in muscle isografts is influenced by the strain, age, and sex of host mice
J. Pathol., 153, 71-82
- Grounds, M.D. (1991)
Towards understanding skeletal muscle regeneration
Path. Res. Pract., 187, 1-22

Grounds, M.D., Garret, K.L., Lay, M.C., Wright, W.E., Beilharz, M.W. (1992)
Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and
Myogenin probes

Cell Tissue Res., 267, 99-104

Grumet, M., Rutishauser, U., Edelman, G.M. (1982)

Neural Cell Adhesion Molecule is on embryonic muscle cells and mediates
adhesion to nerve cells in vitro

Nature, 295, 693-695

Gullberg, D., Velling, T., Sjöberg, G., Salmivirta, K., Gaggero, B., Tiger, C.F.,
Edström, L., Sejersen, T. (1997)

Tenascin-C expression correlates with macrophage invasion in Duchenne
muscular dystrophy and myositis

Neuromuscular Disorders, 7, 39-54

Hasty, P., Bradley, A., Morris, J.H., Edmondson, D.G., Venuti, J.M. Olson, E.N.,
Klein, W.H. (1993)

Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the
Myogenin gene

Nature, 364, 501-506

Hinterberger, T.J., Sassoon, D.A., Rhodes, S.J., Konieczny, S.F. (1991)

Expression of the muscle regulatory factor MRF4 during somite and skeletal
myofiber development

Dev. Biol., 147, 144-156

Hoffman, S., Sorkin, B.C., White, P.C., Brackenbury, R., Mailhammer, R.,
Rutishauser, U., Cunningham, B.A., Edelman, G.M. (1982)

Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from
embryonic Brain Membranes

J. Biol. Chem., 257(13), 7720-7729

Hoh, J.F.Y., McGrath, P.A., White, R.I. (1976)

Electrophoretic analysis of multiple forms of myosin in fast-twitch and slow-twitch muscles of the chick

Biochem J., 157, 87-95

Hosoi, H., Sugimoto, T., Hayashi, Y., Inaba, T., Horii, Y., Morioka, H., Fushiki, S., Hamazaki, M., Sawada, T. (1992)

Differential expression of myogenic regulatory genes, MyoD1 and myogenin, in human rhabdomyosarcoma sublines

Int. J. Cancer, 50, 977-983

Hsia, H.C., Schwarzbauer, J.E. (2005)

Meet the tenascins: multifunctional and mysterious

J. Biol. Chem., 280(29), 26641-26644

Hurme, T., Kalimo, H. (1992)

Adhesion in skeletal muscle during regeneration

Muscle Nerve, 15, 482-489

Hyatt, J.K., Roy, R.R., Baldwin, K.M., Edgerton, V.R. (2003)

Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and Myogenin in satellite cells and myonuclei

Am. J. Physiol., Cell Physiol., 285, C1161-C1173

Ijkema-Paassen, J., Meek, M.F., Gramsbergen, A. (2001)

Muscle differentiation after sciatic nerve transaction and reinnervation in adult rats Ann. Anat., 183, 369-377

Ijkema-Paassen, J., Meek, M.F., Gramsbergen, A. (2002)

Reinnervation of muscles after transection of the sciatic nerve in adult rats

Muscle Nerve, 25, 891-897

Illa, I., Leon-Monzon, M., Dalakas, M.C. (1992)

Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells

Ann. Neurol., 31, 46-52

Irintchev, A., Draguhn, A., Wernig, A. (1990)

Reinnervation and recovery of mouse soleus muscle after long-term denervation Neuroscience, 39, 231-243

Irintchev, A., Salvini, T.F., Faissner, A., Wernig, A. (1993)

Differential expression of tenascin after denervation, damage or paralysis of mouse soleus muscle

J. Neurocytol., 22, 955-965

Janmot, C., D'Albis, A. (1994)

Electrophoretic separation of developmental and adult rabbit skeletal muscle myosin heavy chain isoforms: example of application to muscle Denervation study FEBS Lett., 353, 13-15

Jennekens, F.G.I., Meijer, A.E.F.H., Bethlem, J., van Wijngaarden, G.K. (1974)

Fibre hybrids in type groups: an investigation of human muscle biopsies

J. Neurol. Sci., 23, 337-352

Jerusalem, F. (1979)

Allgemeine Myopathologie, 38-84

in: Jerusalem, F.: Muskelerkrankungen: Klinik, Therapie, Pathologie

1. Auflage, Thieme, Stuttgart

Jin, L., Hemperly J.J., Lloyd, R.V. (1991)

Expression of neural cell adhesion molecule in normal and neoplastic human neuroendocrine tissue

Am. J. Pathol., 138, 961-969

Jones, P.L., Jones, F.S. (2000)

Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function
Matrix Biol., 19, 581-596

Kami, K., Noguchi, K., Senba, E. (1995)

Localization of myogenin, c-fos, c-jun, and muscle-specific gene mRNAs in
regenerating rat skeletal muscle
Cell Tissue Res., 280, 11-19

Kern, H., Boncompagni, S., Rossini, K., Mayr, W., Fano, G., Zanin, M.E.,
Podhorska-Okolow, M., Protasi, F., Carraro, U. (2004)

Long-term denervation in humans causes degeneration of both contractile and
excitation-contraction coupling apparatus, which is reversible by functional
electrical stimulation (FES): a role for myofiber regeneration?
J. Neuropathol. Exp. Neurol., 63, 919-931

Klagsbrun, M. (1989)

The fibroblast growth factor family: structural and biological properties
Prog. Growth Factor Res., 1, 207-235

Knighton, D.R., Hunt, T.K., Scheuenstuhl, H., Halliday, B.J., Werb, Z., Banda,
M.J. (1983)

Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by
macrophages Science, 221, 1283-1285

Koishi, K., Zhang, M., McLennan, I.S., Harris, A.J. (1995)

MyoD protein accumulates in satellite cells and is neutrally regulated in
regenerating myotubes and skeletal muscle fibers
Dev.Dyn., 202, 244-254

Kostrominova, T.Y., Macpherson, P.C.D., Carlson, B.M., Goldman, D. (2000)

Regulation of Myogenin protein expression in denervated muscles from young
and old rats
Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 279, R179-R188

Kostrominova, T.Y., Dow, D.E., Dennis, R.G., Miller, R.A., Faulkner, J.A. (2005)
Comparison of gene expression of 2-mo denervated, 2-mo stimulated-
denervated, and control rat skeletal muscles

Physiol. Genomics, 22, 227-243

Koukoulis, G.K., Gould, V.E., Bhattacharyya, A., Gould, J.E., Howedy, A.A.,
Virtanen, I. (1991)

Tenascin in normal, reactive, hyperplastic, and neoplastic tissues: Biologic and
pathologic implications

Hum. Pathol., 22, 636-643

Langenfeld-Oster, B., Faissner, A., Irintchev, A., Wernig, A. (1994)

Polyclonal antibodies against NCAM and tenascin delay endplate reinnervation

J. Neurocytol., 23, 591-604

Lanier, L.L., Testi, R., Bindl, J., Phillips, J.H. (1989)

Identity of Leu-19 (CD56) Leukocyte Differentiation Antigen and Neural Cell
Adhesion Molecule

J.Exp. Med., 169, 2233-2238

Lassar, A.B., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka,
S.D., Weintraub, H. (1989)

MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc
homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer

Cell, 58, 823-831

Launay, T., Armand, A.S., Charbonnier, F., Mira, J.C., Donsez, E., Gallien, C.L.,
Chanoine, C. (2001)

Expression and neural control of Myogenic Regulatory Factor genes during
regeneration of mouse soleus

J. Histochem. Cytochem., 49, 887-899

Leinwand, L.A., Fournier, R.E., Nadal-Ginard, B., Show, T.B. (1983)
Multigene family for sarcomeric myosin heavy chain in mouse and human DNA:
localization on a single chromosome
Science, 221, 766-769

Lewis, D.M. (1972)
The effect of denervation on the mechanical and electrical responses of fast
and slow mammalian twitch muscle
J. Physiol., 222, 51-75

Li, L., Olson, E.N. (1992)
Regulation of muscle cell growth and differentiation by the MyoD family of helix-
loop-helix proteins
Adv. Cancer Res., 58, 95-119

Lowey, S., Benfield, P.A., LeBlanc, D.D., Waller, G.S. (1983)
Myosin isozymes in avian skeletal muscles. I. Sequential expression of myosin
isozymes in developing chicken pectoralis muscles
J. Musc. Res. Cell Motil., 4, 695-716

Lu, D.X., Huang, S.K., Carlson, B.M. (1997)
Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle
Anat. Rec., 248, 355-365

Mackie, E.J., Tucker, R.P. (1999)
The tenascin-C knockout revisited
J. Cell Sci., 112, 3847-3853

Magnusson, C., Svensson, A., Christerson, U., Tagerud, S. (2005)
Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle
Eur. J. Neurosci., 21, 577-580

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

Mankoo, B.S., Collins, N.S., Ashby, P., Grigorieva, E., Pevny, L.H., Candia, A., Wright, C.V.E., Rigby, P.W.J., Pachnis, V. (1999)

Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development Nature, 400, 69-73

Manz, H.J. (1980)

Pathology of skeletal muscle: principles of reaction patterns and histochemistry and experience with 195 biopsies

Virchows Arch. A Path. Anat. and Histol., 386, 1-19

Mao, J.R., Bristow, J. (2001)

The Ehlers-Danlos syndrome: on beyond collagens

J. Clin. Invest., 107, 1063-1069

Margreth, A., Salvati, G., Di Mauro, S., Turati, G. (1972)

Early biochemical consequences of denervation in fast and slow skeletal muscles and their relationship to neural control over muscle differentiation

Biochem. J., 126, 1099-1110

Marqueste, T., Decherchi, P., Desplanches, D., Favier, R., Grelot, L., Jammes, Y. (2006)

Chronic electrostimulation after nerve repair by self-anastomosis: effects on the size, the mechanical, histochemical and biochemical muscle properties

Acta Neuropathol., 111, 589-600

Masuda-Nakagawa, L.M., Nicholls, J.G. (1991)

Extracellular matrix molecules in development and regeneration of the leech CNS

Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci., 331, 323-335

- Matsuda, R., Bandman, E., Strohman, R.C. (1982)
The two myosin isoenzymes of chicken anterior latissimus dorsi muscle contain different myosin heavy chains encoded by separate mRNAs
Differentiation, 23, 36-42
- Matsuda, R., Bandman, E., Strohman, R.C. (1983)
Regional differences in the expression of myosin light chains and tropomyosin subunits during development of chicken breast muscle
Dev. Biol., 95, 484-491
- Matsuda, R., Spector, D., Strohman, R.C. (1984)
Denervated skeletal muscle displays discoordinate regulation for the synthesis of several myofibrillar proteins
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 1122-1125
- McGeachie, J., Allbrook, D. (1978)
Cell proliferation in skeletal muscle following denervation or tenotomy
Cell Tiss. Res., 193, 259-267
- Megeney, L.A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J.E., Rudnicki, M.A. (1996)
MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle
Genes Dev., 10, 1173-1183
- Midrio, M., Betto, D.D., Betto, R., Noventa, D., Antico, F. (1988)
Cordotomy-denervation interactions on contractile and myofibrillar properties of fast and slow muscles in the rat
Exp. Neurol., 100, 216-236
- Midrio, M., Danieli-Betto, D., Megighian, A., Betto, R. (1997)
Early effects of denervation on sarcoplasmic reticulum properties of slow-twitch rat muscle fibres
Pflugers Arch., 434, 398-405
- Midrio, M. (2006)
The denervated muscle: facts and hypothesis. A historical review
Eur. J. Appl. Physiol., 98, 1-21

Miledi, R., Slater, C.R. (1968)

Electrophysiology and electronmicroscopy of rat neuromuscular junctions after nerve degeneration

Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci., 169, 289-306

Miledi, R., Slater, C.R. (1969)

Electron-microscopic structure of denervated skeletal muscle

Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci., 174, 253-269

Miledi, R., Slater, C.R. (1970)

On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section

J. Physiol., 207, 507-528

Minasi, M.G., Riminucci, M., De Angelis, L., Borello, U., Berarducci, B., Innocenzi, A., Caprioli, A., Sirabella, D., Baiocchi, M., De Maria, R., Boratto, R., Jaffredo, T., Broccoli, V., Bianco, P., Cossu, G. (2002)

The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues

Development, 129, 2773-2783

Mirsky, R., Jessen, K.R., Schachner, M., Goridis, C. (1986)

Distribution of the adhesion molecules N-CAM and L1 on peripheral neurons and glia in adult rats.

J. Neurocytol., 15(6), 799-815

Mohun, T. (1992)

Muscle differentiation

Curr. Opin. Cell Biol., 4, 923-928

Montag-Sallaz, M., Montag, D. (2003)

Severe cognitive and motor coordination deficits in Tenascin-R-deficient mice

Genes Brain Behav., 2, 20-31

Moore, S.E., Walsh, F.S. (1985)

Specific Regulation of NCAM/D2-CAM cell adhesion molecule during skeletal muscle development

EMBO J., 4, 623-630

Moore, S.E., Walsh, F.S. (1986)

Nerve dependent regulation of neural cell adhesion molecule expression in skeletal muscle

Neuroscience, 18, 499-505

Moore, S.E., Thompson, J., Kirkness, V., Dickson, J.G., Walsh, F.S. (1987)

Skeletal muscle neural cell adhesion molecule (N-CAM): Changes in protein and mRNA species during myogenesis of muscle cell lines

J. Cell Biol., 105, 1377-1386

Müller-Felber, W., Küllmer, K., Fischer, P., Reimers, C.D., Wagner, S., Harland, U., Schmidt-Achert, M., Pongratz, D. (1993)

Fibre type specific expression of Leu19-antigen and N-CAM in skeletal muscle in various stages after experimental denervation

Virchows Archiv A Pathol. Anat. Histopathol., 422, 277-283

Müller-Felber, W., Toepfer, M., Müller, T., Müller-Hocker, J., Fischer, P., Lochmüller, H., Pongratz, D. (1998)

Tenascin is a useful marker in the diagnosis of inflammatory myopathies

Eur. J. Med. Res., 3, 281-287

Murray, B.A., Hemperly, J.J., Prediger, E.A., Edelman, G.M., Cunningham, B.A. (1986)

Alternatively spliced mRNAs code for different polypeptide chains of the chicken neural cell adhesion molecule (N-CAM)

J. Cell Biol., 102, 189-193

Murray, M.A., Robbins, N. (1982)

Cell proliferation in denervated muscle: identity and origin of dividing cells

Neurosci., 7, 1823-1833

Mussini, I., Favaro., G., Carraro, U. (1987)

Maturation, dystrophic changes and the continuous production of fibers in skeletal muscle regenerating in the absence of nerve

J. Neuropathol. Exp. Neurol., 46, 315-331

Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I., Nabeshima, Y. (1993)

Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect

Nature, 364, 532-535

Nakayama, J., Fukuda, M.N., Frederette, B., Ranscht, B., Fukuda, M. (1995)

Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7031-7035

Nguyen, C., Mattei, M.G., Mattei, J.F., Santoni, M.J., Goridis, C., Jordan, B.R. (1986)

Localization of the human NCAM-gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11.

J. Cell Biol., 102, 711-715

Nguyen, H.T., Gubits, R.M., Wydro, R.M., Nadal-Ginard, B. (1981)

Sarcomeric myosin heavy chain is coded by a highly conserved multigene family Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 5230-5234

Niiyama, T., Higuchi, I., Osame, M. (1999)

Expression of thrombomodulin, caveolin-3, and desmin on muscle fibers in neuromuscular diseases

Muscle Nerve, 22, 1713-1716

- Noble, M., Albrechtsen, M., Moller, C., Lyles, J., Bock, E., Goridis, C., Watanabe, M., Rutishauser, U. (1985)
Glial cells express N-CAM/D2-CAM-like polypeptides in vitro
Nature, 316, 725-728
- Obinata, T., Saitoh, O., Takano-Ohmuro, H. (1984)
Effect of denervation on the isoform transitions of tropomyosin, troponin T, and myosin isozyme in chicken breast muscle
J. Biochem., 95, 585-588
- Olivé, M., Martinez-Matos, J.A., Pirretas, P., Povedano, M., Navarro, C., Ferrer, I. (1997)
Expression of myogenic regulatory factors (MRFs) in human neuromuscular disorders
Neuropathol. Appl. Neurobiol., 23, 475-482
- Olson, E.N. (1992)
Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage
Dev. Biol., 154, 261-272
- Olsen, M., Krog, L., Edvardsen, K., Skovgaard, L.D., Bock, E. (1993)
Intact transmembrane isoforms of the neural cell adhesion molecule are released from the plasma membrane
Biochem. J., 295, 833-840
- Olson, E. (1992)
Activation of muscle-specific transcription by myogenic helix-loop-helix proteins
Symp. Soc. Exp. Biol., 46, 331-341
- Olson, E.N. (1993)
Signal transduction pathways that regulate skeletal muscle gene expression
J. Mol. Endocrinol., 7, 1369-1378

Ontell, M. (1974)

Muscle satellite cells: a validated technique for light microscopic identification and a quantitative study of changes in their population following denervation
Anat. Rec., 178, 211-228

Owens, G.C., Edelman, G.M., Cunningham, B.A. (1987)

Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: Alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 294-298

Palacios, D., Puri, P.L. (2006)

The epigenetic network regulating muscle development and regeneration
J. Cell Physiol., 207, 1-11

Palexas, G.N., Savage, N., Isaacs, H. (1981)

Characteristics of sarcoplasmic reticulum from normal and denervated rat skeletal muscle
Biochem. J., 200, 11-15

Papadimitriou, J.M., Robertson, T.A., Mitchell, C.A., Grounds, M.D. (1990)

The process of new plasmalemma formation in focally injured skeletal muscle fibers
J. Struct. Biol., 103, 124-134

Parham, D.M., Dias, P., Bertorini, T., von Wronski, M.A., Horner, L., Houghton, P. (1994)

Immunohistochemical analysis of the distribution of MyoD1 in muscle biopsies of primary myopathies and neurogenic atrophy
Acta Neuropathol., 87, 605-611

Perry, R.L., Rudnick, M.A. (2000)

Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation
Front. Biosci., 5, D750-D767

Pesheva, P., Gloor, S., Probstmeier, R. (2001)

Tenascin-R as a regulator of CNS glial cell function
Prog. Brain Res., 132, 103-114

Probstmeier, R., Nellen, J., Gloor, S., Wernig, A., Pesheva, P. (2001)
Tenascin-R is expressed by Schwann cells in the peripheral nervous system
J. Neurosci. Res., 64, 70-78

Relaix, F., Buckingham, M. (1999)
From insect eye to vertebrate muscle: redeployment of a regulatory network
Genes Dev., 13, 3171-3178

Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., Buckingham, M. (2005)
A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells
Nature, 435, 948-953

Relaix, F. (2006)
Skeletal muscle progenitor cells: from embryo to adult
Cell. Mol. Life Sci., 63, 1221-1225

Rescan, P.Y. (2001)
Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates
Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol., 130, 1-12

Rhodes, S.J., Konieczny, S.F. (1989)
Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene
family Genes Dev., 3, 2050-2061

Rieger, F., Grumet, M., Edelman, G. M. (1985)
N-CAM at the Vertebrate Neuromuscular Junction
J. Cell Biol., 101, 285-293

Ringelmann, B., Röder, C., Hallmann, R., Maley, M., Davies, M., Grounds, M.,
Sorokin, L. (1999)
Expression of laminin $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, and $\alpha 5$ chains, fibronectin, and tenascin-C in
skeletal muscle of dystrophic 129ReJ dy/dy mice
Exp. Cell Res., 246, 165-182

- Robbins, J., Freyer, G.A., Chisholm, D., Gilliam, T.C. (1982)
Isolation of multiple genomic sequences coding for chicken myosin heavy chain protein
J. Biol. Chem., 257, 549-556
- Roy, R.K., Sréter, F.A., Sarkar, Satyapriya (1979)
Changes in tropomyosin subunits and myosin light chains during development of chicken and rabbit striated muscles
Dev. Biol., 69, 15-30
- Rushbrook, J.I., Stracher, A. (1979)
Comparison of adult, embryonic, and dystrophic myosin heavy chains from chicken muscle by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis and peptide mapping
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76, 4331-4334
- Russell, S.D., Cambon, N.A., Whalen, R.G. (1993)
Two types of neonatal-to-adult fast myosin heavy chain transitions in rat hindlimb muscle fibers
Dev. Biol., 157, 359-370
- Russo, T.L., Peviani, S.M., Freria, C.M., Gigo-Benato, D., Geuna, S., Salvini, T.F. (2007)
Electrical stimulation based on chronaxie reduces atrogen-1 and myoD gene expressions in denervated rat muscle
Muscle Nerve, 35, 87-97
- Rutishauser, U., Thiery, J.P., Brackenbury, R., Sela, B.A., Edelman, G.M. (1976)
Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 577-581
- Rutishauser, U., Hoffman, S., Edelman, G.M. (1982)
Binding properties of a cell adhesion molecule from neural tissue
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 685-689

- Rutishauser, U., Grumet, M., Edelman, G.M. (1983)
Neural cell adhesion molecule mediates initial interactions between spinal cord neurons and muscle cells in culture
J. Cell Biol., 97, 145-152
- Rutishauser, U., Acheson, A., Hall, A.K., Mann, D.M., Sunshine, J. (1988)
The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions Science, 240, 53-57
- Sacheck, J.M., Hyatt J.P., Raffaello A., Jagoe R.T., Roy R.R., Edgerton V.R., Lecker, S.H., Goldberg, A.L. (2007)
Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases
FASEB J.; 21,140-155
- Saga, Y., Yagi, T., Ikawa, Y., Sakakura, T., Aizawa, S. (1992)
Mice develop normally without Tenascin
Genes Dev., 6, 1821-1831
- Saghatelian, A., de Chevigny, A., Schachner, M., Lledo, P.M. (2004)
Tenascin-R mediates activity dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain
Nat. Neurosci., 7, 347-356
- Salmons, S., Ashley, Z., Sutherland, H., Russold, M.F., Li, F., Jarvis, J.C. (2005)
Functional electrical stimulation of denervated muscles: basic issues
Artif. Organs, 29, 199-202
- Sartore, S., Gorza, L., Schiaffino, S. (1982)
Fetal myosin heavy chains in regenerating muscle
Nature, 298, 294-296

- Sassoon, D., Lyons, G., Wright, W.E., 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
- Sawchak, J.A., Lewis, S., Shafiq, S.A. (1989)
Coexpression of myosin isoforms in muscle of patients with neurogenic disease
Muscle Nerve, 12, 679-689
- Schäfer K., Braun, T. (1999)
Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h
Nat. Genet., 23, 213-216
- Schiaffino, S., Gorza, L., Pitton, G., Saggin, L., Ausoni, S., Sartore, S., Lomo, T. (1988)
Embryonic and neonatal myosin heavy chain in denervated and paralyzed rat skeletal muscle
Dev. Biol., 127, 1-11
- Schmalbruch, H. (1976)
The morphology of regeneration of skeletal muscle in the rat
Tissue Cell, 8, 673-692
- Schmalbruch, H., Al-Amood, W.S., Lewis, D.M. (1991)
Morphology of long-term denervated rat soleus muscle and the effect of chronic electrical stimulation
J. Physiol., 441, 233-241
- Schmalbruch, H., Lewis, D.M. (1994)
A comparison of the morphology of denervated with aneurally regenerated soleus muscle of rat
J. Musc. Res. Cell Motil., 15, 256-266

Schmalbruch, H., Lewis, D.M., Chir, B. (2000)

Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles

Muscle Nerve, 23, 617-626

Schoser, B.G.H., Goebel, H.H. (1996)

Tenascin in denervated human muscle

J. Neurol. Sci., 139, 203-209

Schuetze, S.M. (1987)

Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptors

Ann. Rev. Neurosci., 10, 403-457

Schultz, E. (1978)

Changes in the satellite cells of growing muscle following Denervation

Anat. Rec., 190, 299-312

Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., Rudnicki, M.A. (2000)

Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells

Cell, 102, 777-786

Sesodia, S., Cullen, M.J. (1991)

The effect of denervation on the morphology of regenerating rat soleus muscles

Acta Neuropathol., 82, 21-32

Settles, D.L., Cihak, R.A., Erickson, H.P. (1996)

Tenascin-C expression in dystrophin-related muscular dystrophy

Muscle Nerve, 19, 147-154

Shiotani, A., Flint, P.W. (1998)

Myosin heavy chain composition in rat laryngeal muscles after Denervation

Laryngoscope, 108, 1225-1229

Silver, J., Rutishauser, U. (1984)

Guidance of optic axons in vivo by a preformed adhesive pathway on neuroepithelial endfeet

Dev. Biol., 106, 485-499

Sevire, N.J., Malone, M. (2003)

Myogenin and MyoD1 expression in paediatric rhabdomyosarcomas

J.Clin. Pathol., 56, 412-416

Snow, M.H. (1983)

A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse

Anat. Rec., 207, 593-604

Sréter, F.A. (1970)

Effect of denervation on fragmented sarcoplasmic reticulum of white and red muscle Exp. Neurol., 29, 52-64

Sréter, F.A., Bálint, M., Gergely, J.(1975)

Structural and functional changes of myosin during development

Dev. Biol., 46, 317-325

Tajbakhsh, S., Buckingham, M. E. (1994)

Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5

Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91, 747-751

Tang, H., Cheung, W.M.W., Ip, F.C.F., Ip, N.Y. (2000)

Identification and characterization of differentially expressed genes in denervated muscle

Mol. Cell Neurosci., 16, 127-140

Tang, J., Jo, S.A., Burden, S.J.(1994)

Separate pathways for synapse-specific and electrical activity-dependent gene expression in skeletal muscle

Development, 120, 1799-1804

Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Cheng, P.F., Weintraub, H., Lassar, A.B. (1988)

MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts

Science, 242, 405-411

Tews, D.S., Goebel, H.H., Schneider, I., Gunkel, A., Stennert, E., Neiss, W.F. (1994)

Morphology of experimentally denervated and reinnervated rat facial muscle: I. Histochemical and histological findings

Eur. Arch. Otorhinolaryngol., 251, 36-40

Tews, D.S., Goebel, H.H., Schneider, I., Gunkel, A., Stennert, E., Neiss, W.F. (1997)

Expression Profile of Stress Proteins, Intermediate Filaments, and Adhesion Molecules in experimentally denervated and reinnervated rat facial muscle

Exp. Neurol., 146, 125-134

Tews, D.S., Goebel, H.H. (2005)

Diagnostic immunohistochemistry in neuromuscular disorders

Histopathol., 46, 1-23

Thanos, S., Bonhoeffer, F., Rutishauser, U. (1984)

Fiber-fiber interaction and tectal cues influence the development of the chicken retinotectal projection

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1906-1910

Tosney, K.W., Watanabe, M., Landmesser, L., Rutishauser, U. (1986)

The distribution of NCAM in the chick hindlimb during axon outgrowth and synaptogenesis

Dev. Biol., 114, 437-452

- Viguie, C.A., Lu, D.X., Huang, S.K., Rengen, H., Carlson, B.M. (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, S.L., Przyborski, M., Badylak, S.F., Konieczny, S.F. (1993)
Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles
Dev. Dyn., 198, 214-224
- Vracko, R., Benditt, E.P. (1972)
Basal lamina: the scaffold for orderly cell replacement
J. Cell Biol., 55, 406-419
- Wagatsuma, A., Osawa, T. (2006)
Time course of changes in angiogenesis-related factors in denervated muscle
Acta Physiol., 187, 503-509
- Wagers, A.J., Conboy, I.M. (2005)
Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis
Cell, 122, 659-667
- Walsh, F.S., Ritter, M.A. (1981)
Surface antigen differentiation during human myogenesis in culture
Nature, 289, 60-64
- Walsh, F.S., Moore, S.E. (1985)
Expression of cell adhesion molecule, N-CAM, in diseases of adult human skeletal muscle
Neurosci. Lett., 59(1), 73-78
- Walsh, F.S., Moore, S.E., Lake, B.D. (1987)
Cell adhesion molecule N-CAM is expressed by denervated myofibres in Werdnig-Hoffman and Kugelberg-Welander type spinal muscular atrophies
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr., 50, 439-442

Wang, X.M., Tsay, H.J., Schmidt, J. (1990)

Expression of the acetylcholine receptor δ -subunit gene in differentiating chick muscle cells is activated by an element that contains two 16bp copies of a segment of the α -subunit enhancer

EMBO J., 9(3), 783-790

Weber, P., Bartsch, U., Rasband, M.N., Czaniera, R., Lang, Y., Bluethmann, H., Margolis, R.U., Levinson, S.R., Shrager, P., Montag, D., Schachner, M. (1999)

Mice deficient for Tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS

J. Neurosci., 19(11), 4245-4262

Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T.K., Turner, E., Rupp, R., Hollenberg, S (1991)

The MyoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage Science, 251, 761-766

Weis, J. (1994)

Jun, Fos, MyoD1, and Myogenin proteins are increased in skeletal muscle fiber nuclei after Denervation

Acta Neuropathol., 87, 63-70

Weis, J., Kaussen, M., Calvo, S., Buonnano, A. (2000)

Denervation induces a rapid nuclear accumulation of MRF4 in mature myofibers Dev. Dyn., 218, 438-451

Whalen, R.G., Sell, S.M., Butler-Browne, G.S., Schwartz, K., Bouveret, P., Pinset-Harstom, I. (1981)

Three myosin-heavy chain isozymes appear sequentially in rat muscle development Nature, 292, 805-809

Whalen, R.G., Harris, J.B., Butler-Browne, G.S., Sesodia, S. (1990)

Expression of myosin isoforms during notexin-induced regenerating of rat soleus muscle

Dev. Biol., 141, 24-40

- Whitby, D.J., Ferguson, M.W.J. (1991a)
The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice
Development, 112, 651-668
- Whitby, D.J., Longaker, M.T., Harrison, M.R., Adzick, N.S., Ferguson, M.W.J.
(1991b)
Rapid epithelialisation of fetal wounds is associated with the early deposition of
Tenascin
J. Cell Sci., 99, 583-586
- Winter, A., Bornemann, A. (1999)
NCAM, Vimentin and neonatal myosin heavy chain expression in human
muscle diseases
Neuropathol. Appl. Neurosci., 25, 417-424
- Witzemann, V., Sakmann, B. (1991a)
Differential regulation of MyoD and Myogenin mRNA levels by nerve induced
muscle activity
FEBS Lett., 282(2), 259-264
- Witzemann, V., Brenner, H.R., Sakmann, B. (1991b)
Neural factors regulate AChR subunit mRNAs at rat neuromuscular synapses
J. Cell Biol., 114, 125-141
- Wright, W.E., Sassoon, D.A., Lin, V.K. (1989)
Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD
Cell, 56, 607-617
- Wydro, R.M., Nguyen, H.T., Gubits R.M., Nadal-Ginard, B. (1983)
Characterization of sarcomeric myosin heavy chain genes
J. Biol. Chem., 258, 670-678
- Yablonka-Reuveni, Z., Rivera, A.J. (1994)
Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during
myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers
Dev. Biol., 164, 588-603

Yoshimi, T., Mimura, N., Aimoto, S., Asano, A. (1993)

Transitional expression of neural cell adhesion molecule isoforms during chicken embryonic myogenesis

Cell Struct. Funct., 18, 1-11

Zammit, P.S., Golding, J.P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T.A., Beauchamp, J.R. (2004)

Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?

J. Cell Biol., 166, 347-357

Zweers, M.C., van Vlijmen-Willems, I.M., van Kuppevelt, T.H., Mecham, R.P., Steijlen, P.M., Bristow, J., Schalkwijk, J. (2004)

Deficiency of Tenascin-X causes abnormalities in dermal elastic fiber morphology J. Invest. Dermatol., 122, 885-891

Zhou, Z., Cornelius, C.P., Eichner, M., Bornemann, A. (2006)

Reinnervation-induced alterations in rat skeletal muscle

Neurobiol. Dis., 23, 595-602

Abkürzungsverzeichnis

AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPDA	Adenosine Monophosphate Desaminase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
COMP1	cooperates with myogenic proteins 1
COX	Cytochrom-c-Oxidase
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DD	Differentialdiagnose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMG	Elektromyographie
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fn	Fibronectin
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
HE-Färbung	Färbung mit Hämatoxylin und Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IBM	Inclusion Body Myositis (Einschlusskörperchenmyositis)
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
MEF2	myocyte-specific enhancer factor-2
MHC	Myosin Heavy Chain

Abkürzungsverzeichnis

MHCn	Myosin Heavy Chain neonatal
MHCs	Myosin Heavy Chain slow
MRF	Myogener regulatorischer Faktor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSD1	muskelspezifische Domäne 1
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NF1	Nuclear Factor 1
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
o.B.	ohne Befund
PAS	Periodic acid-Schiff
PNP	Polyneuropathie
PS	Polysialinsäure
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SMA	spinale Muskelatrophie
TBS	Tris Bufferd Saline
V.a.	Verdacht auf

Danksagungen

Danksagungen

Mein Dank gilt:

-Frau Professor A. Bornemann für die Themenstellung, die großartige Betreuung, ihre Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

-Herrn Dr. med. M. Mittelbronn für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

-Herrn Carsten Henneges für die Hilfe bei allen Computerfragen.

-Allen Mitarbeitern des Instituts für Hirnforschung, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Lebenslauf

Name:	Kathrin Janina Doppler
Geburtsdatum:	10.07.1983
Geburtsort:	Ludwigsburg
1990-1994	Kasteneckschule (Grundschule) in Freiberg am Neckar
1994-2003	Oscar-Paret-Schule, Abteilung Gymnasium, in Freiberg am Neckar
Juni 2003	Abitur
Oktober 2003	Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
September 2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Januar 2006	Beginn der Dissertation bei Frau Prof. Bornemann am Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen mit dem Titel „Denervation und Reinnervation in humanen Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie“
24.11.2009	Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)