

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
des Universitätsklinikums Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus V. Toyka

**Expression des fetalen Acetylcholinrezeptors im Muskel bei experimenteller
Nervenläsion der Ratte und bei Neuropathien des Menschen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Cindy Erika Elisabeth Fischer
aus Leinach

Würzburg, November 2008

Referent: Prof. Dr. med. Karlheinz Reiners
Koreferent: Prof. Dr. med. Stefan Gattenlöhner
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.6.2009

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANA-Titer	antinukleärer Antikörper-Titer
Aqua dest.	Aqua destillata
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIDP	chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
PNP	Polyneuropathie
CK	Creatinkinase
cm	Zentimeter
D	Deutschland
DD	Differentialdiagnose
DAB	Diaminobenzidin-Peroxidase
DEPC	Diethylprocarbonat
dNTP	Desoxyribonukleosid-5`-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dt Primer	desoxythymidin Primer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMG	Elektromyogramm
et al.	et alii
Fa.	Firma
fACh-R	fetaler-Acetylcholinrezeptor
g	Gramm
gamma-ACh-R	gamma-Acetylcholinrezeptor
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogencarbonat
kg	Kilogramm

li.	links
Lsg.	Lösung
LWK	Lendenwirbelkörper
m	männlich
M.	Musculus
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transkriptase
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
mV	milli Volt
N.	Nervus
nACh-R	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamiddehydrogenase
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
Nr.	Nummer
PBS	phosphate-buffered saline
pH	Abkürzung für Potenz (p) und Maß für die Wasserstoffionenkonzentration (H)
re.	rechts
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
sec.	Sekunde(n)
Sek-AK	Sekundärantikörper
SEM	Standard error of the mean
SMA	Spinale Muskelatrophie
Tabl.	Tabelle

TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel
µm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Aufbau der quergestreiften Muskulatur	1
1.2 Muskelfasertypen (Muskelzelltypen)	2
1.3 Motorische Endplatte	3
1.4 Der nikotinerge Acetylcholinrezeptor (nACh-R)	4
1.5 Muskelatrophie	6
1.6 Neuromuskuläre Erkrankungen	6
1.7 Ziel dieser Arbeit	8
2. Materialien und Methoden	11
2.1 Tieroperationstechniken	11
2.2 Humanmuskelbiopsien	12
2.3 Histochemische Färbungen	13
2.3.1 NADH Tetrazoliumreduktase	13
2.3.2 ATPase	13
2.4 Immunhistochemische Färbung des fetalen ACh-R-Antikörpers	16
2.5 Histologische Analysen	17
2.6 RT-PCR	18
2.6.1 RNA-Isolierung und Aufreinigung	18
2.6.2 c-DNA-Synthese und Amplifikation mittels RT-PCR	19
2.6.3 Gelelektrophorese	20
3. Ergebnisse	22
3.1 Auswertungen der Immunhistochemie der Rattenmuskulatur	22
3.2 Ergebnisse der RT-PCR von Rattenmuskulatur	27
3.3 Auswertungen der Immunhistochemie der Humanmuskulatur	27
3.4 Vergleich der Ergebnisse der Untersuchungen von Ratten- und Humanmuskulatur	33

4.	Diskussion	34
5.	Zusammenfassung	38
6.	Literaturverzeichnis	40

1. Einleitung

1.1 Aufbau der quergestreiften Muskulatur

Die quergestreifte Muskulatur ist aus Muskelfaserbündeln, deren Durchmesser ca. 100-1000 μm beträgt, aufgebaut. Makroskopisch sind diese als „Fleisch-Fasern“ zu erkennen. Das einzelne Faserbündel setzt sich aus Muskelfasern, welche auch als Muskelzellen bezeichnet werden, zusammen. Sie haben einen Durchmesser von circa 10-100 μm und sind im Skelettmuskel bis zu 15 cm lang. Als Sarkolemm wird die Zellmembran der Muskelzelle bzw. -faser bezeichnet. Sie umschließt das Sarkoplasma, mehrere Zellkerne, Sarkosomen (Mitochondrien), die Stoffe zur Sauerstoff- und Energiegewinnung sowie einige hundert Myofibrillen (Silbernagl und Despopoulos, 2003, Abb. 1).

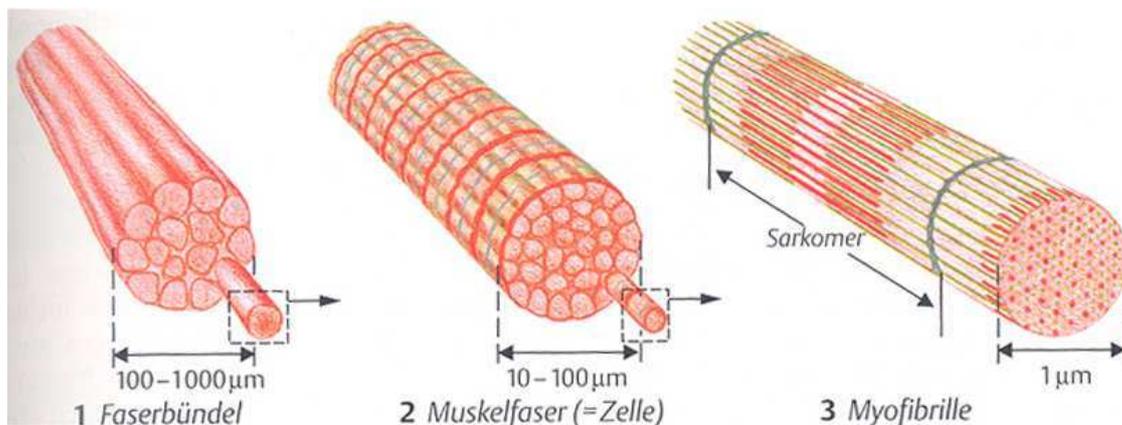


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Feinbaus der quergestreiften Muskulatur (nach Warshaw D.M., aus Silbernagl und Despopoulos 2003)

Die Myofibrillen werden durch die sogenannten Z-Scheiben in 2 μm lange Fächer, die Sarkomere unterteilt. Unter mikroskopischer Betrachtung lassen diese abwechselnd helle und dunkle Bänder und Linien erkennen, die durch die Anordnung der Myosin-II- und Aktinfilamente verursacht werden. Aus diesen strukturellen Merkmalen leitet sich die Bezeichnung quergestreifte Muskulatur ab.

1.2 Fasertypen (Muskelzelltypen)

Die Skelettmuskelfaser kann anhand morphologischer, biochemischer, elektrophysiologischer und funktioneller Eigenschaften in zwei Hauptfasergruppen eingeteilt werden. Es werden zum einen die sogenannten „roten“ Typ-I-Fasern sowie zum anderen die „weißen“ Typ-II-Fasern unterschieden.

Die Typ-I-Fasern sind grundsätzlich kleiner als die Typ-II-Fasern, jedoch reicher an Myoglobin. Die Energiebereitstellung erfolgt vorwiegend über die aerobe Verstoffwechslung von Glukose und freien Fettsäuren in Citratzyklus und Atmungskette. Die Kapillarisation ist ausgeprägter als die der Typ-II-Fasern. Sie enthalten zahlreiche Mitochondrien und Neutralfettdepots und weisen eine höhere oxidative, jedoch eine geringere glykolytische Aktivität auf. Die Aktivität der Myosin-ATPase ist im Vergleich zur Typ-II-Faser niedriger. Die Typ-I-Fasern kontrahieren sich vergleichsweise langsamer, können aber den Kontraktionsvorgang länger aufrechterhalten und dadurch eine ausdauernde Muskelarbeit leisten. Der Kontraktionsvorgang wird häufig als tonisch beschrieben.

Die Typ-II-Fasern sind größer und besitzen eine grössere Anzahl an Myofibrillen und eine geringere Anzahl an Mitochondrien. Die Energiebereitstellung erfolgt vorwiegend über anaerob-alaktazide und –laktazide Stoffwechselwege mit hohen Energieflussraten. Sie weisen eine hohe glykolytische Kapazität und eine hohe Myosin-ATPase-Aktivität auf. Das sarkoplasmatische Retikulum gewährleistet höhere Kalziumtransportraten als das der Typ-I-Fasern. Diese Faktoren tragen zur schnellen, phasischen Kontraktion bei (McArdle et al., 2001). Eine Unterteilung der Typ-II-Fasern in die drei Subtypen (IIa, IIb, IIc) erfolgt anhand der schweren Myosinkette, der Mitochondrienanzahl und des bevorzugten Energiestoffwechsels.

Die unterschiedlichen Fasertypen sind im querschnittenen Muskel des Menschen nach einem Mosaik- oder Schachbrettmuster angeordnet. Dieser typische Aufbau entspricht dem Prinzip der motorischen Einheit.

Eine motorische Einheit wird grundsätzlich als das Soma einer motorischen Vorderhornzelle im Rückenmark mit ihrem Axon sowie dessen

Endabzweigungen, den terminalen Axonen mit allen von ihnen innervierten Muskelfasern definiert. Alle Muskelfasern einer motorischen Einheit gehören dem selben Fasertyp an. Da diese aber nicht unmittelbar nebeneinander liegen, sondern dazwischen viele Muskelfasern anderer motorischer Einheiten liegen, entsteht das typische Mosaikmuster bei der ATPase-Färbung, bei der sich die verschiedenen Fasertypen unterschiedlich dunkel darstellen. Die Erscheinungsart des Mosaikmusters wird durch das Vorliegen des jeweiligen dominierenden Hauptfasertyps bestimmt. In überwiegend tonischen Muskeln, z.B. kurze Rückenmuskeln, dominieren Typ-I-Fasern und in überwiegend phasischen Muskeln, z. B. M. biceps brachii, herrschen die Typ-II-Fasern vor. In oberflächlichen Muskelschichten finden sich hauptsächlich Typ-II-Fasern, hingegen sind die tiefen Schichten von Typ-I-Fasern geprägt. Die in Muskelbiopsien gefundene physiologische Fasertypenprädominanz beruht vermutlich auf hereditären Grundlagen.

1.3 Motorische Endplatte

Als motorische Endplatte oder neuromuskuläre Endplatte (Abb.2) wird die Synapse zwischen dem Axon eines Motoneurons und der Skelettmuskelfaser bezeichnet. Hier findet die Erregungsübertragung von der Nervenzelle auf die Skelettmuskulatur statt

Der Transmitter ist Acetylcholin (ACh), welches an die nikotinerge Acetylcholinrezeptoren (ACh-R) der subsynaptischen Muskelzellmembran (= Sarkolemm) bindet. Die ACh-R fungieren als Ionenkanäle. Sobald sich an die beiden alpha-Untereinheiten ein Acetylcholin-Molekül bindet, öffnet sich der Kanal für einen kurzen Zeitraum von circa 1 ms. Die Offenwahrscheinlichkeit des Acetylcholinrezeptors wird durch die ACh-Konzentration im synaptischen Spalt bestimmt. Der Kanal ist kationenspezifisch und es kommt bei einem Ruhepotential von etwa -90 mV vor allem zu einem Natrium-Einstrom und einem Kalium-Ausstrom und somit zur Depolarisation. Die Abschaltung der synaptischen Übertragung erfolgt durch den Abbau des Acetylcholins im

synaptischen Spalt durch die Acetylcholinesterasen und seiner Abdiffusion aus dem Spalt.

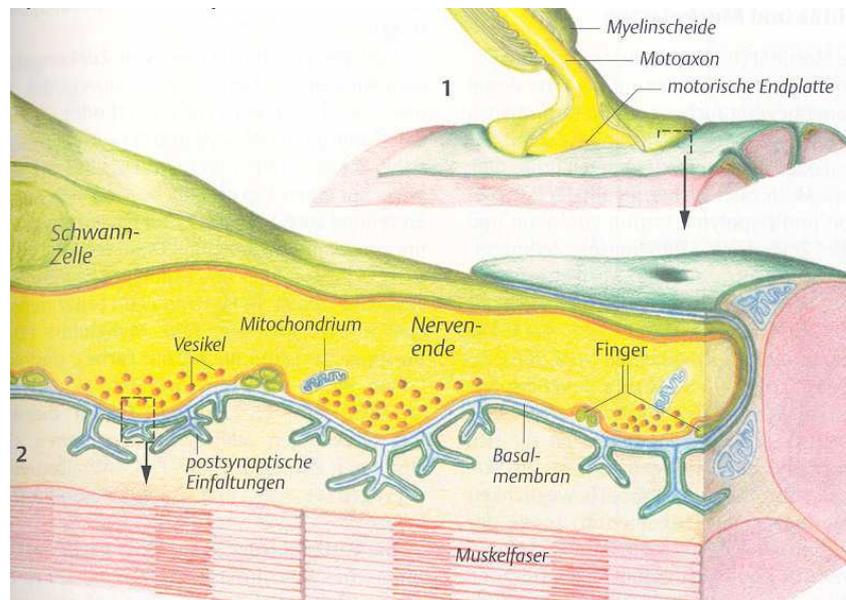


Abbildung 2: Aufbau der motorischen Endplatte ((1) nach Neher und Sakmann, (2) nach Peper und Mitarbeiter (Silbernagl und Despopoulos, 2003))

Die motorische Endplatte kann durch Gifte (z.B. Botulinustoxin) und bestimmte Medikamente (Curare-ähnliche Substanzen, wie Tubocurarin) blockiert werden, Muskelschwäche und Lähmung sind die Folge.

1.4 Der nikotinerge Acetylcholinrezeptor (nACh-R)

Der nikotinerge Acetylcholinrezeptor ist in der gesunden Muskulatur des erwachsenen Menschen aus fünf Untereinheiten aufgebaut. Er besteht aus zwei Alpha-, einer Beta-, einer Delta- und einer Epsilon-Untereinheit (Changeux et al., 1992). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sich der ultrastrukturelle Aufbau in der fetalen und der denervierten Muskulatur unterscheidet und sich während der Entstehung der neuromuskulären Synapse verändert. Dabei findet ein Austausch der Epsilon-Untereinheit gegen eine Gamma-Untereinheit statt. In dieser Variante besteht das Pentamer daher aus zwei Alpha-, einer Beta-, einer Delta- und einer Gamma-Untereinheit (Mishina

et al., 1985; Witzmann et al., 1987). In dieser Zusammensetzung wird er als fetaler Acetylcholinrezeptor (fACh-R) (Abb. 3) bezeichnet.

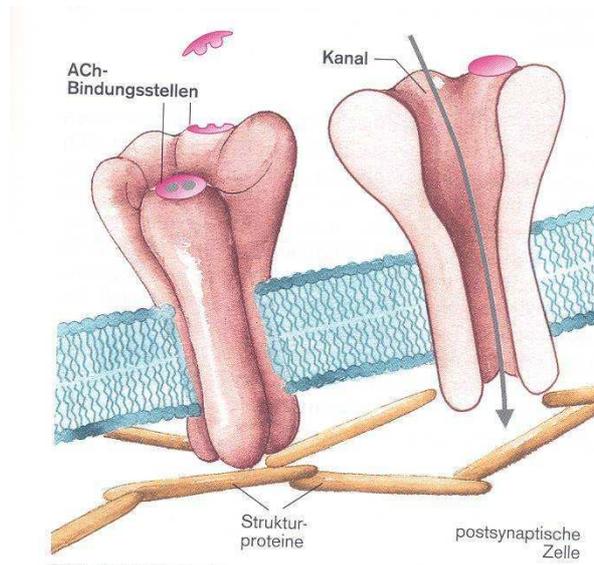


Abbildung 3: Dreidimensionales Modell des nikotinergen Acetylcholinrezeptors, der in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran schwimmt. Das Protein besteht aus fünf Untereinheiten, von denen zwei identische die Bindungsstellen für das Acetylcholin tragen (nach Kistler J. et al., aus Klinke und Silbernagl, 1996).

Beim gesunden Erwachsenen wird der fACh-R nur im Thymus und einigen wenigen extraokulären Muskelfasern (Horton et al., 1993; Kaminski et al., 1996; Mac Lennan et al., 1997) exprimiert. Unter Verwendung der „RNase protection assays“-Methode sowie alternativ der Reversen Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)-Methode konnten in der übrigen innervierten Muskulatur eines erwachsenen Menschen nur ein sehr geringer Grad von Transkripten der Gamma-Untereinheit des ACh-R nachgewiesen werden (Hara et al., 1993; Marx et al., 1989).

In tierexperimentellen Studien konnte nach Durchtrennung/Quetschung eines peripheren Nerven ein Anstieg der Expression des fetalen Acetylcholinrezeptors festgestellt werden (Witzmann et al., 1987). Ebenso konnte dies in der Muskulatur von Erwachsenen mit chronischen neurogenen Muskelerkrankungen (Corriveau et al., 1995, Romano et al., 1997, Gattenlöhner et al., 2002) gezeigt werden.

Die Tatsache, dass der fetale nikotinerge Acetylcholinrezeptor sowohl in fetaler als auch in denervierter Muskulatur zu finden ist, führte zur Vermutung, dass er eine Rolle beim Aufbau und/oder Stabilisierung der motorischen Endplatte spielt (Fischer et al., 1999).

1.5 Muskelatrophie

Eine Muskelatrophie entsteht bei einer Schädigung des peripheren Nervs, aber auch bei Inaktivität des Muskels. Im Folgenden soll insbesondere die neurogene Muskelatrophie betrachtet werden. Das morphologische Substrat der Muskelatrophie ist sehr heterogen in seiner Ausprägung. So findet sich bei neurogenen Prozessen die feldförmig gruppierte, volumetrische Atrophie von Muskelfasern. Andere neurogene Prozesse mit klinisch ausgeprägter Atrophie sind durch den Verlust motorischer Einheiten und der zugehörigen Muskelfaser gekennzeichnet. Die hierbei noch erhaltenen Muskelfasern sind häufig hypertrophiert.

Ebenfalls besteht nicht in jedem Fall eine positive Korrelation zwischen der Muskelatrophie und der resultierenden Muskelschwäche. Bei neurogenen Erkrankungen können stark ausgeprägte distale Muskelatrophien mit vergleichsweise geringer Muskelschwäche vorliegen. Bei Myopathien, Myasthenie oder Myositiden kann in der klinischen Untersuchung trotz ausgeprägter Muskelschwäche oft keine oder nur eine geringe Atrophie festgestellt werden. Auch bei dystrophischen Prozessen kann der Parenchymausfall in solchem Maße durch eine lipomatöse und/ oder mesenchymale Proliferation kompensiert sein, so dass sich klinisch kein Hinweis auf eine Atrophie ergibt. Zudem kann die Muskelatrophie durch das Vorliegen von ausgeprägten subkutanen Fettdepots maskiert sein.

1.6 Neuromuskuläre Erkrankungen

Im Begriff des neuromuskulären Systems spiegelt sich die funktionelle Abhängigkeit der Skelettmuskulatur von der Innervation durch das periphere

Nervensystem wieder. Eine Schädigung im Bereich des peripheren Nervensystems (Neuropathie), welche hereditären, entzündlichen, metabolischen, endokrinen oder toxischen Ursprungs sein kann, führt obligat zu einer Affektion der quergestreiften Muskulatur. Klinisch kennzeichnend für die neurogenen und /oder myogenen Erkrankungen sind Muskelschwäche, Muskelschwund, Muskelhypotonie, Muskelatrophie beziehungsweise (Pseudo)-Hypertrophie sowie normale, abgeschwächte oder bei hochgradigen Paresen fehlende Muskeleigenreflexe.

Unter Polyneuropathie versteht man die Erkrankung mehrerer peripherer Nerven, wobei es nach der Art der betroffenen Nervenfasern zu motorischen, sensiblen oder vegetativen Ausfällen kommen kann. Die häufigsten Ursachen dieser Erkrankung sind der chronische Alkoholabusus sowie der Diabetes mellitus. Es kommen aber auch entzündliche Erkrankungen (z.B. akute Polyneuritis Guillain-Barré, chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)), das Auftreten bei Immunvaskulitiden oder Kollagenosen (z.B. Panarteriitis nodosa, Churg-Strauss-Syndrom), toxische Ursachen (z.B. Medikamente, Industriegifte) und hereditäre Einflüsse in Betracht.

Weiterhin werden die Erkrankungen des zweiten Motoneurons betrachtet, welche unter dem Begriff der spinalen Muskelatrophien (SMA) zusammengefasst werden. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe zumeist erblicher Erkrankungen, bei denen die Vorderhornzellen des Rückenmarks und teilweise auch die motorischen Hirnnervenkerne degenerieren. Gemeinsame Merkmale dieser Erkrankungen sind die progressive Muskelschwäche mit Muskelschwund („Amyotrophie“) und das Fehlen von Sensibilitätsstörungen, vegetativen Ausfällen und kognitiven Defiziten. Wegweisend kann die Muskelbiopsie sein, um die verschiedenen Formen spinaler Muskelatrophie von myopathischen Prozessen zu differenzieren. Eine kausale Therapie steht aktuell für keine Form der spinalen Muskelatrophie zur Verfügung. Vielmehr steht die symptomatische Therapie v.a. Physiotherapie im Vordergrund.

Zu den neuromuskulären Erkrankungen zählen ferner neuromuskuläre Transmissionsstörungen wie die Myasthenia gravis, die zur Muskelschwäche

führt. Dabei sind bei der rein okulären Form nur die Augenmuskeln einschließlich der Lidheber beeinträchtigt, bei der generalisierten Form kommt es zu ermüdbarer Schwäche insbesondere der bulbären und der proximalen Muskulatur.

Als primäre Erkrankungen der Muskulatur sind Muskeldystrophien, metabolische Myopathien, und Myositiden zu nennen, die ebenfalls typischerweise zur Muskelschwäche führen.

Um zur genauen Diagnose einer neuromuskulären Erkrankung zu gelangen, stehen heute vielfältige Untersuchungsmöglichkeiten zur Verfügung. Diese reichen von der Bestimmung spezieller Serumenzyme (z.B. Creatinkinase (CK)), neurophysiologischer Untersuchungen (motorische und sensible Neurographien), Elektromyogramm (EMG) über bildgebende Verfahren (Kernspintomographie, Pyrophosphatszintigraphie) bis zur Nerven- und Muskelbiopsie. Gerade die Muskelbiopsie ermöglicht neben der standardmäßig durchgeführten histologischen Begutachtung inklusive Untersuchung im Hinblick auf entzündliche Veränderungen und zelluläre Infiltrate sowie die Fasertypisierung zusätzlich immunhistochemische Untersuchungen (Gencik et al., 1999).

Da die Ursachen neuromuskulärer Erkrankungen vielfältig sind, sind therapeutische Möglichkeiten höchst unterschiedlich. Während eine kausale Therapie bei erblichen Erkrankungen wie spinalen Muskelatrophien, hereditären Neuropathien oder Muskeldystrophien nicht zur Verfügung steht, sondern v.a. physiotherapeutische Maßnahmen im Vordergrund stehen, gibt es hochwirksame Therapiemöglichkeiten bei immunologisch bedingten Erkrankungen wie bei der CIDP, bei Myositiden oder der Myasthenia gravis.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Aufgrund zahlreicher Studien sind Aufbau und Funktion des nikotinergeren Acetylcholinrezeptors des Menschen bekannt (Changeux et al., 1997). Die fetale Form des Acetylcholinrezeptors wird im gesunden Muskel eines Erwachsenen hauptsächlich im Thymus und in der extraokulären Muskulatur

(Horton et al., 1993; Kaminski et al., 1996; Mac Lennon et al.) exprimiert. In unterschiedlichen Studien konnten bereits die Veränderungen der Transkription des fetalen Acetylcholinrezeptors, zum einen bei experimentell veränderter neuromuskulärer Übertragung (Tsujihata et al., 2001), zum anderen bei neuromuskulären Erkrankungen, wie z.B. der diabetischen Neuropathie (Vincent und Newsom-Davis, 1982) oder amyotrophen Lateralsklerose (Tsujihata et al., 2001) nachgewiesen worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine tierexperimentelle Studie zur Untersuchung der Expression des fACh-Rezeptors während der Denervierung beziehungsweise Reinnervation der Muskelzellen nach experimenteller Ligatur des Nervus ischiadicus durchgeführt. Hierbei erfolgte bei 20 männlichen Wistar-Ratten eine Ligatur des N. ischiadicus, die zu einer kompletten axonalen Läsion des Nerven führt. Nach einer Woche wurde die Ligatur gelöst, um eine Regeneration der Nervenfasern zu ermöglichen. Bei jeweils einer Gruppe von Tieren wurden Muskelproben 3,6, 9 und 12 Wochen nach Läsion gewonnen. Es sollte eine Fasertypisierung der den fACh-R exprimierenden Muskelzellen sowie der zeitliche Verlauf der Expression und die Reaktion der Muskelzelle auf die experimentelle Denervierung dargestellt werden.

Hierfür wurden zum einen aus den gewonnenen Muskelproben Schnitte und anschließend die für den fetalen Acetylcholinrezeptor spezifische Antikörperfärbung angefertigt. Zum anderen wurde die RNA aus den Muskelzellen isoliert, cDNA synthetisiert und mittels RT-PCR für den fetalen Acetylcholinrezeptor nachgewiesen.

Zur klinischen Einordnung der erzielten Ergebnisse wurde zusätzlich die Expression des fetalen Acetylcholinrezeptors bei neurogenen Muskelerkrankungen des Menschen und dessen möglicher Zusammenhang mit der Degeneration oder Regeneration der betroffenen Muskelzelle anhand von humanen Muskelbiopsien bei verschiedenen histologisch gesicherten neurogenen Muskelerkrankungen untersucht. Die Biopsien waren zur Diagnosefindung aus rein klinischer Indikation entnommen worden. Nachdem später die Biopsien nach klinischen Daten ausgewählt worden waren, wurde

das Einverständnis der Patienten zu zusätzlichen Untersuchungen aus dem vorhandenen Biopsiematerial eingeholt.

2. Materialien und Methoden

2.1 Tieroperationstechniken

Es wurden 20 männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 200 und 250 g operiert. Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg Ketamin (Ketanest) und 10 mg/kg Xylazin (Rompun) anästhesiert. Nach Rasur und Desinfektion des Operationsgebietes wurde die Haut distal des Tuber ischiadicus inzidiert und die Faszie eröffnet. Mittels stumpfer Präparation der Muskulatur wurde der Nervus ischiadicus am Tuber ischiadicum aufgesucht und freigelegt. Der Nerv wurde mit einem Faden umschlungen und mit zwei festen Knoten ligiert. Daraufhin wurden Faszie und Haut mit jeweils 3-4 Einzelknopfnähten verschlossen. Nach einem Zeitraum von sieben Tagen wurden die Tiere nach einem identischen Narkoseprotokoll anästhesiert, die Wunde eröffnet und die Knoten unter Schonung des Nerven unter mikroskopischer Kontrolle vorsichtig gelöst, um seine Regeneration zu ermöglichen.

Die Tiere wurden in fünf Gruppen zu je 3-5 Tieren eingeteilt. Die Tiere der jeweiligen Gruppe wurden mittels einer intraperitoneal verabreichten Überdosis Ketamin und Xylazin euthanasiert. Von Tieren der ersten Gruppe wurden am Tag der Läsionslösung, also nach einer Woche, je drei Proben des M. gastrocnemius von ca. 1 cm Länge und 4 mm Durchmesser entnommen. Einer Gruppe von Tieren wurden entsprechende Muskelgruppen jeweils 3, 6, 9 und 12 Wochen nach Läsion entnommen. Die Biopsien wurden direkt nach Entnahme in mittels flüssigem Stickstoff gekühlten Isopentan eingefroren. Im weiteren Verlauf wurden von den Gewebeproben 20 Schnitte von 15 µm Stärke im Kryostaten angefertigt, auf Objektträger aufgetragen und fixiert. Die gewonnenen Schnitte wurden hiernach mittels der weiter unten beschriebenen Färbungen gefärbt und die weiteren histologischen Analysen durchgeführt.

2.2 Humanmuskelbiopsien

Untersucht wurden Muskelbiopsien von sechs Patienten mit histologisch gesicherten neurogenen Muskelerkrankungen. Die Biopsien wurden aus rein klinischer Indikation zur Diagnosefindung unter sterilen operativen Bedingungen gewonnen. Die Biopsien wurden nach klinischen Daten ausgewählt. Aus dem vorliegenden Biopsiematerial wurden die zusätzlichen Untersuchungen durchgeführt, nachdem das Einverständnis der Patienten zu diesen zusätzlichen Untersuchungen eingeholt worden war.

Biopsie-Nr.	Alter/ Geschlecht der Patienten	Biopsierter Muskel	Erkrankungs- dauer bis zur Biopsie	Diagnose
1	63 Jahre weiblich	M. vastus lateralis links	20 Jahre	Vaskulitische Polyneuropathie und interstitielle Myositis bei Mischkollagenose und Sjögren-Syndrom
2	67 Jahre w	M. gastrocnemius links	2 Jahre	Vaskulitische Schwerpunktneuropathie
3	80 Jahre w	M. vastus lateralis links	Ca. 9 Monate	Schwere axonale Polyneuropathie
4	62 Jahre männlich	M. tibialis anterior links	7 Jahre	Gemischte sensomotorische axonale Polyneuropathie, DD: Unterform der SMA
5	35 Jahre w	M. tibialis anterior rechts	5 Jahre	Vaskulitische Polyneuropathie
6	73 Jahre m	M. tibialis anterior links	einige Monate	Axonale sensomotorische Polyneuropathie

Tabelle 1: Überblick über die vorliegenden Humanmuskelbiopsien, das Alter der Patienten zum Biopsiezeitpunkt, Geschlecht, den Entnahmeort der Biopsie, der Krankheitsdauer bis zum Zeitpunkt der Biopsie sowie der histologisch gesicherten Erkrankung.

2.3 Histochemische Färbungen

2.3.1 Nicotinamiddehydrogenase (NADH)-Färbung

30 mg Nitroblau-Tetrazoliumchlorid wurden in 18 ml destilliertem Wasser und 60 mg NADH in 12 ml Sörensen-Puffer (Lsg. A: 1/15 M KH_2PO_4 (sauer) und Lsg. B: 1/15 M Na_2HPO_4 (alkalisch) gegeneinander auf pH 7,6 titriert) gelöst. Anschließend wurden die Lösungen zusammengeführt und kurz gemischt. Die Lösungen wurden auf die Schnitte aufgetragen und es folgte eine Inkubationszeit von 1h bei 37°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung dekantiert und die Schnitte wurden mit Aqua destillata gespült. Anschließend wurden die Schnitte über zweimal 2 Minuten in 70 % Isoalkohol, 96 % Isoalkohol und 100 % Isoalkohol sowie über zweimal 5 Minuten in Xylol entwässert. Am Ende wurden die Schnitte mit Vitro-Clud[®] eingedeckt.

Färbeergebnis:

Typ-I-Fasern = dunkelblau

Typ-II-Fasern = hellblau

Reagenzien:

- Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, Fa. Serva.
- NADH (= Nicotinamiddehydrogenase), Fa. BM.
- KH_2PO_4 (= Kaliumdihydrogencarbonat), Fa. Merck.
- Na_2HPO_4 (= Dinatriumhydrogenphosphat), Fa. Merck.

2.3.2 ATPase-Färbung

Zunächst erfolgte die Herstellung der einzelnen für die ATPase-Färbung benötigten Lösungen:

Lösung A:

19,4 g Natriumacetat
+ 29,4 g Natriumbarbital
in Aqua dest. lösen

Saure Vorinkubationslösung:

200 ml Lsg.A
+ 400 ml 0,1 M Salzsäure.
+ 80 ml 8,5 % NaCl
+ 320 ml Aqua dest.
auf pH 4,6 eingestellt

Alkalische Vorinkubationslösung:

200 ml 0,1 M Natriumbarbitallsg.
+ 200 ml 0,18 M Calciumchloridsg.
+ 600 ml Aqua dest.
auf pH 9,4 eingestellt

Hauptinkubationslösung:

200 ml 0,1 M Natriumbarbitallsg.
+ 100 ml 0,18 M Calciumchloridsg.
+ 700 ml Aqua dest.
auf pH 9,4 eingestellt

Hauptinkubationslösung mit ATP:

250 mg ATP in 100 ml Hauptinkubationslösung im
Erlenmeyerkolben gelöst und auf pH 9,4 eingestellt

Vor Beginn der Färbung erfolgte eine Überprüfung der pH-Werte der Lösungen unter Beachtung der vorliegenden Temperatur.

Die zu färbenden Schnitte für die ATPase-Färbung pH 4,6 wurden in eine Küvette gestellt und mit der sauren Vorinkubationslösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden diese mit der Hauptinkubationslösung gespült. Hiernach erfolgte eine 45minütige Inkubationszeit mit der Hauptinkubationslösung mit ATP bei 37°C.

Nach einem zeitlichen Intervall von 15 Minuten erfolgte die fünfzehnminütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur der Schnitte zur pH 9,4-Färbung in der

alkalischen Vorinkubationslösung. Anschließend wurden diese in der Hauptinkubationslösung mit ATP für erneute 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit in der Hauptlösung wurden alle Schnitte dreimal mit 1 % Calciumchloridlösung für insgesamt zehn Minuten und anschließend einmal für drei Minuten mit 2 % Kobaltchloridlösung sowie fünfmal mit 0,01 M Natriumbarbitallösung für fünf Minuten gewaschen. Danach wurde nochmals gut mit Leitungswasser gespült. Die Färbung wurde nun in 45 sec. in 1 % Ammoniumsulfidlösung (1 ml Ammoniumsulfid auf 100 ml Aqua dest.) entwickelt. Es wurde wiederum mit Leitungswasser gut gespült. Anschließend wurden die Schnitte in 70 % Isopropanol, 96 % Isopropanol, 100 % Isopropanol für jeweils zweimal zwei Minuten und für zweimal fünf Minuten in Xylol zur Entwässerung gestellt. Zum Abschluss erfolgte die Eindeckung in Vitro-Clud®.

Färbeergebnis:

pH 9,4:	Typ-I-Fasern = hellbraun
	Typ-II-Fasern = dunkelbraun
pH 4,6:	Typ-I-Fasern = dunkelbraun
	Typ-II-Fasern = hellbraun

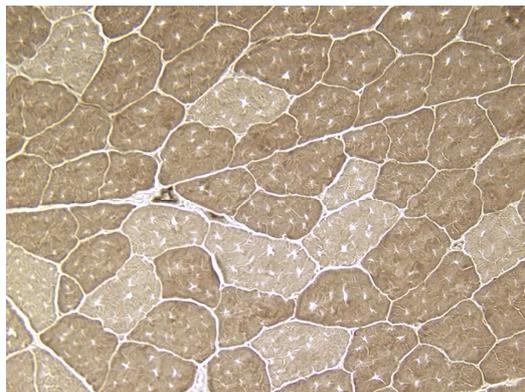


Abbildung 4: ATPase-Färbung pH 9,4 eines Humanmuskelquerschnitts (40-fache Vergrößerung). Bei den hellbraun angefärbten Muskelzellen handelt es sich um Typ-I-Fasern, bei den dunkelbraun angefärbten um Typ-II-Fasern.

Reagenzien:

- Natriumacetat wasserfrei, Fa. Merck

- Natriumbarbital (= 5,5 Di-Ethylbarbitursäure-Na-Salz), Fa. Merck
- Salzsäure 0,1 M, Fa. Merck
- NaCl, Fa. Merck
- Calciumchlorid, Fa. Merck
- ATP (= Adenosin-5-triphosphorsäure Dinatriumsalz), Fa. Merck
- Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat, Fa. Merck
- Ammoniumsulfid, Fa. Merck

2.4 Immunhistochemische Färbung des fetalen ACh-R-Antikörpers

Die zuvor angefertigten Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger aufgezogen und trockneten bei Raumtemperatur über Nacht. Hiernach erfolgte zunächst die Entparaffinierung und der Durchlauf einer absteigenden Alkoholreihe ab 70 %igem Ethanol bis zum Xylol. Die Schnitte wurden dann im Dampftopf mit target retrieval solution für 5 Minuten gekocht. Anschließend wurden die Schnitte unter fließendem Wasser abgelöscht und mit Leitungswasser abgekühlt. Hiernach folgte die Überführung in PBS-Puffer.

Zunächst erfolgte die 10-minütige Inkubation mit 1 % BSA in PBS bei Raumtemperatur um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermeiden. Während der Inkubationszeit wurde der Primär-AK angesetzt (Verdünnung mit 1 %igem BSA) und es wurden 100 µl auf jeden Muskelschnitt aufgetragen. Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur dauerte 1 Stunde. Anschließend erfolgte die Spülung mit PBS bei pH 7,4. Hiernach wurde der biotinierte Sek-AK (1:400 verdünnt) aufgetragen und eine Inkubationszeit von 20 min. bei Raumtemperatur folgte. Im Weiteren wurden die Schnitte mit PBS gespült und Streptavidin-Peroxidase wurde aufgetragen. Eine Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur schloß sich an. Hierauf erneutes Spülen mit PBS.

Der DAB-Gebrauchspuffer wurde mittels einer 5 ml Spritze mit Spritzenfilter auf die Schnitte gegeben mit folgender 10-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden im Anschluß 2-mal mit Aqua dest.

gespült und mit Hämalaun gegengefärbt. Zum Abschluss erfolgte die Eindeckung in Vitro-Clud®.

Färbeergebnis:

fACh-R positiv = Braunfärbung der Muskelzellmembran

Reagenzien/Geräte:

- Primär-Ak (= ACh-R gamma, goat polyclonal), Fa. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca
- Sekundär-AK (polyclonal rabbit anti goat Immunglobulines, biotinylated), Fa. DAKO Cytomotion, Glostrup, DK
- Target retrieval solution, Fa. DAKO
- DAB (= Diaminobenzidin-Peroxidase), Fa. SIGMA
- PBS (= phosphate-buffered saline)
- BSA (= bovines Serumalbumin)
- HRP Streptavidin, Fa. Zytomed, San Francisco, CA
- Dampfdrucktopf, Silit, Riedlingen, D
- Färbeautomat, Genesis RSP 200, Fa. TECAN, Crailsheim, D

2.5 Histologische Analysen

Die histologischen Schnitte wurden nach den entsprechenden Färbungen der weiteren mikroskopischen Analyse unterzogen. Hierbei wurden am Lichtmikroskop (Axiovert 25, Fa. Zeiss Jena) von repräsentativen Schnitten in den Vergrößerungen 10 x, 20 x, 40 x und 100 x Fotos angefertigt und digital archiviert. Im Anschluß wurden pro Präparat 200 bis 300 Zellen nach den folgenden festgelegten Kriterien ausgewertet. Zunächst erfolgte die Analyse der Immunhistochemischen Färbungen mit Bestimmung der Gesamtzahl und des Anteils der fACh-R-positiven Zellen. Im Weiteren wurden die fACh-R-positiven Muskelfasern nach atrophen und nicht-atrophen Fasern unterschieden. Als atrophe Muskelzellen wurden diejenigen Fasern gewertet, welche eine deutlich verkleinerte Querschnittsfläche aufwiesen und sich meist länglich darstellten.

Anschließend erfolgte eine Gegenüberstellung der immunhistochemischen Färbung mit den Fasertypisierungs-färbungen ATPase pH 4,6 und pH 9,4 sowie NADH, um die fACh-R-positiven Myozyten den Fasertypen I und II zuordnen zu können.

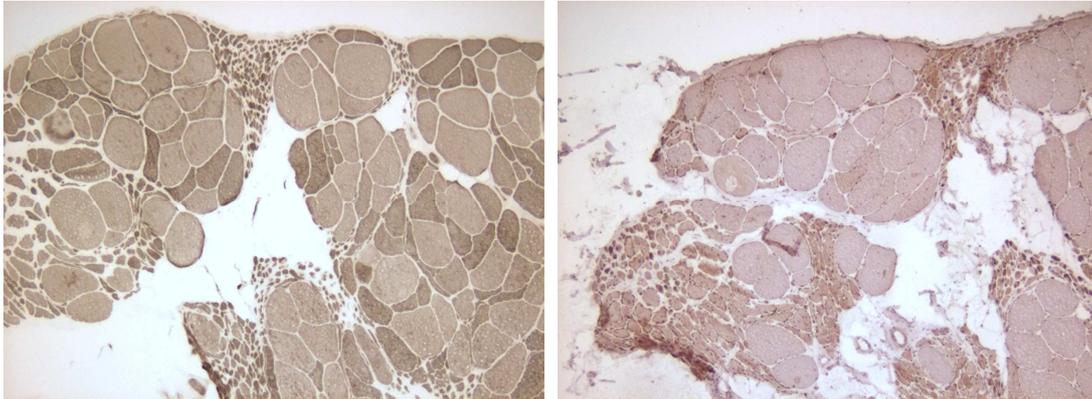


Abbildung 5: ATPase- pH 9,4 (linkes Bild) und fetale Acetylcholinrezeptor-Ak-Färbung (rechtes Bild) eines Humanmuskelquerschnitts (10-fache Vergrößerung). Im linken Bild stellen sich die Typ-I-Muskelzellen hellbraun und die Typ-II-Muskelzellen dunkelbraun dar. Im rechten Bild sind die für den fACh-R positiven Zellen bräunlich angefärbt, die für den fACh-R negativen Zellen zeigen diese Färbung nicht.

2.6 RT-PCR

2.6.1 RNA-Isolierung und Aufreinigung

Zur Isolierung der RNA wurden 100 Schnitte von 20 µm Stärke im Kryostaten geschnitten und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Das so gewonnene Material wurde in 800 µl 4 M Guanidium-Lösung sonifiziert. Die DNA wurde mechanisch durch mehrfaches Aufziehen durch eine Kanüle verkleinert. Der Gesamtinhalt der Spritze wurde in eine 2 ml-Eppendorf-Küvette überführt. Anschließend wurden je 800 µl Phenol, 320 µl Chloroform und 160 µl 2 M NaAcetat pH 4 zugegeben und gründlich gemischt. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurde für 20 Minuten bei 4°C und 13000 rpm (=12000 g) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und wie oben mit Phenol, Chloroform und Natriumacetat versetzt. Diese Lösung wurde erneut

gemischt und unter den beschriebenen Bedingungen zentrifugiert (Inkubation auf Eis entfällt). Die obere Phase wurde wiederum abgenommen und mit 1 ml Isopropanol vermischt. Nun wurden die Eppendorf-Küvetten bis zum Einfrieren in flüssigen Stickstoff eingetaucht und 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 800 µl 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde erneut 10 min zentrifugiert und das Pellet nach Entfernen des Ethanols im Heizblock bei 65°C getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 30 µl DEPC-H₂O gelöst. Der RNA-Gehalt der Suspension wurde photometrisch nach der folgenden Formel bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt.

$$c[\mu\text{mol}/\text{ml}] = OD_{260} \times V \times F$$

V entspricht dem jeweiligen Verdünnungsfaktor, während der Multiplikationsfaktor F für RNA 40 und für DNA 50 beträgt. Als Reinheitsmaß diente das Verhältnis OD₂₆₀ zu OD₂₈₀.

Die gewonnene RNA wurde anschließend in gleichen Gewichtsanteilen zur c-DNA-Synthese verwendet.

Geräte:

- Heizblock, Fa. Liebisch, D
- Multicycler

2.6.2 DNA-Synthese und Amplifikation mittels RT-PCR

Zu je 10 µl der isolierten mRNA wurden je 2 µl oligo-dt Primer (Fa. MWG Biotech) und 1 µl random primer gegeben. Hiernach folgte eine 10 minütige Inkubation bei 65°C. Anschließend folgte eine Inkubation auf Eis. Im Weiteren wurde zu jeder Probe 5,2 µl DEPC-H₂O, 5 µl Amplif.-Puffer, 2,5 µl DTT 100 mmol, 2,5 µl dNTP 10 mmol 1 µl MMLV reverse Transkriptase und 0,8 µl RNAsin hinzugegeben. Es erfolgte eine erneute Inkubation der Proben für 70 Minuten bei 37°C und abschließend eine Denaturierung bei 98°C. Das hierbei entstandene Kondenswasser wurde vor dem Einfrieren abzentrifugiert.

Mittels PCR wurde aus der hergestellten cDNA unter Verwendung sequenzspezifischer Primer (Vorwärts (F) Fgamma-AChR; 5' ATCTCAGTCACCTACTTCCCC 3'; Rückwärts (R) Rgamma-AchR, 5'TACTTGCTGATGAGTGGCACC 3') das Transkript der gamma-Untereinheit des Acetylcholinrezeptors amplifiziert.

Zu einem Mastermix aus 5 µl 10 x PCR-Puffer, 3,5 µl 25 mM MgCl₂, 4 µl dNTP (25 mM), je 1 µl Primer F-gamma und R-gamma sowie 0,5 µl TAQ-Polymerase (Fa. Health Care) und 32,3 µl H₂O wurden 3 µl cDNA gegeben.

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

1. einleitende Denaturierung: 3 min. bei 94°C
2. wiederholte Denaturierung: 30 sec. bei 94°C
3. Primer/Template Annealing: 30 sec. bei 66°C
4. Polymerisation: 30 sec. bei 72°C
5. abschließend 7 min. bei 72°C

Die Schritte 2-4 wurden in einer Schleife 35-mal wiederholt.

Reagenzien/Geräte:

- PCR-Maschine: Primus 96plus, MWG-Biotech
- Primer, Fa. MWG Biotech
- MMLV-RT (= Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transkriptase), Fa. MWG Biotech
- TAQ-Polymerase, Fa. Health Care

2.6.3 Gelelektrophorese

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde ein 1,5 % Agarose-Gel verwendet. Hierzu wurden 1,5 g Agarose-DNA/RNA-Gel-Pulver in einem Erlenmeyerkolben zusammen mit 100ml TBE-Puffer in einer Mikrowelle erhitzt. Danach wurden 7,5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und die Gele in eine entsprechende Gelelektrophoresekammer gegossen. Die Probengröße des PCR-Produktes betrug 10 µl. Die Elektrophorese wurde für 45 min bei 140 V

durchgeführt. Die Gele wurden unter UV-Licht in einem *Digital Imager* analysiert und es wurden digitale Bilder zur weiteren Auswertung gespeichert.

Reagenzien/ Geräte:

- Gelelektrophoresekammer, Pharmacia Biotech GNA
- TBE-Puffer (= Tris-Borat-EDTA-Puffer)

3. Ergebnisse

3.1 Auswertung der immunhistologischen Färbung der Rattenmuskulatur

In der durchgeführten tierexperimentellen Studie erfolgte bei 20 Wistar-Ratten eine Ligatur des Nervus ischiadicus am Tuber ischiadicum. Die experimentelle Nervenquetschung erfolgte für den festgesetzten Zeitraum von einer Woche. Nach diesem Zeitraum wurde bei der ersten Gruppe von Tieren Muskelgewebe entnommen. Bei den anderen Tieren wurde die Ligatur gelöst, um eine Nervenregeneration zu ermöglichen. Bei diesen Gruppen wurden die Muskelproben jeweils 3, 6, 9 und 12 Wochen nach Läsion entnommen. Im weiteren Verlauf wurden Muskelschnitte angefertigt und es erfolgten die NADH- und ATPase-Färbungen zur Fasertypisierung sowie die spezifische immunhistologische Färbung zur Analyse der Expression des fACh-Rezeptors.

In der Immunhistologie fanden sich in den direkt nach Lösen der Ligatur gewonnenen Muskelbiopsien keine Muskelzellen, die den fACh-R exprimieren. In den 3 Wochen später entnommenen Biopsien exprimierten bis zu $52 \% \pm 8,14 \%$ (standard error of the mean, SEM) aller Muskelzellen den fACh-R, wobei $66,7 \% \pm 1,09 \%$ (SEM) hiervon atrophe Zellen waren. 6 Wochen nach experimenteller Nervenquetschung zeigte sich kein weiterer Anstieg in der Gesamtexpression des fACh-R, jedoch ein deutlicher Zuwachs in der Expression des Rezeptors bei atrophen Muskelzellen mit bis zu 100 %, womit zugleich der Höhepunkt erreicht wurde. Denn bereits 9 Wochen nach Beendigung der künstlichen Denervierung war sowohl die Gesamtexpression als auch die Expression des fACh-R bei atrophen Muskelzellen rückläufig und belief sich noch auf $55 \% \pm 10,67 \%$ (SEM) beziehungsweise $79,7 \% \pm 13,08 \%$ (SEM) und war in der letzten Gruppe, 12 Wochen nach Entfernen der Ligatur, nur noch bei einem Tier mit $25,8 \% \pm 5,75 \%$ (SEM) Gesamtexpression und einem Anteil von $24,4 \% \pm 5,45 \%$ (SEM) bei atrophen Muskelzellen nachzuweisen. Bei den anderen Tieren aus dieser Gruppe fanden sich keine atrophen Muskelzellen mehr, die den fACh-R exprimieren (siehe Abb. 6 und 7 sowie Tabelle 2).

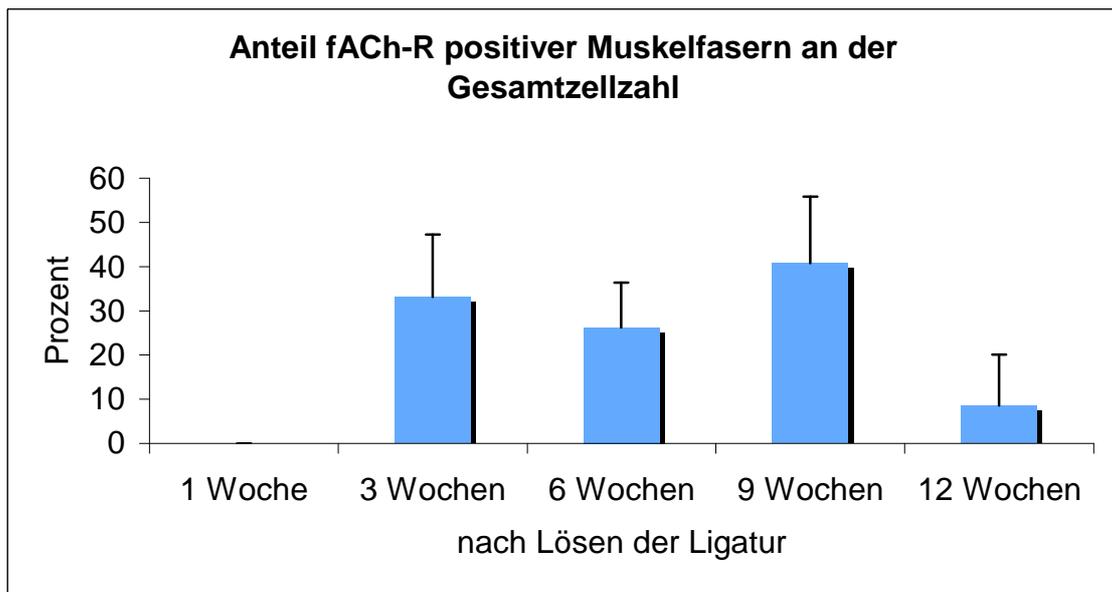


Abb. 6: Zeitlicher Verlauf der Gesamt-Expression des fetalen Acetylcholinrezeptors (bei atrophen und nicht-atrophen Muskelfasern) nach Lösen der experimentell gesetzten Ligatur des Nervus ischiadicus rechts im Rattenmodell.

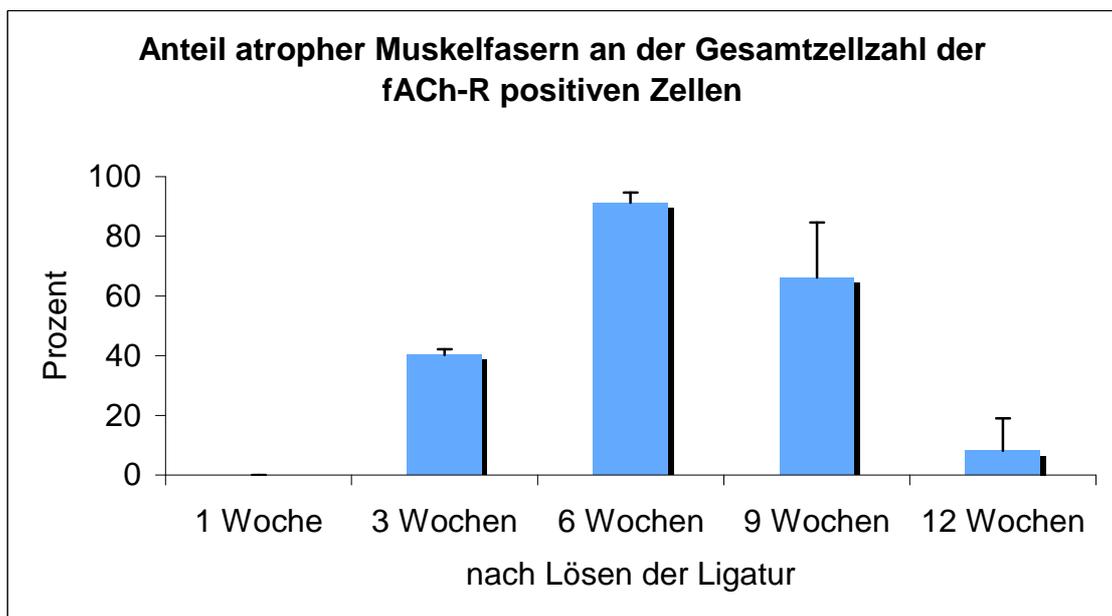


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der Expression des fetalen Acetylcholinrezeptors bei atrophen Muskelfasern im Verhältnis zur Gesamtexpression des fACh-R.

<i>Biopsie – Nr.</i>	<i>Zeitpunkt nach Läsion</i>	<i>Anzahl beurteilter Zellen/ Anteil fACh-R positiver Zellen</i>	<i>Anteil fACh-R positiver atropher Zellen an den Gesamtpositiven</i>	<i>Faser- typisierung positiver atropher Fasern</i>	<i>Faser- typisierung positiver nicht- atropher Fasern</i>
M1	1 Woche	100/0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
M2	1 Woche	120/0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
M3	1 Woche	150/0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
	Mean (± SEM)	0 % (± 0 %)	0 % (± 0 %)		

M5	3 Wochen	300/55 (18,3 %)	23 (41,8 %)	Typ-II	Typ-I
M6	3 Wochen	300/125 (41,6 %)	51 (40,8 %)	Typ-II	Typ-I
M7	3 Wochen	300/118 (39,3 %)	45 (38,1 %)	Typ-II	Typ-I
M8	3 Wochen	300/156 (52 %)	104 (66,7 %)	Typ-II	Typ-I
	Mean (± SEM)	33,1 % (± 8,14 %)	40,25 % (± 1,09 %)		

M9	6 Wochen	237/64 (27 %)	60 (93,8 %)	48 Typ-II/ 12 Typ-I	Typ-I
M10	6 Wochen	269/79 (29,4 %)	69 (87,3 %)	Typ-II	Typ-I
M11	6 Wochen	300/67 (22,3 %)	62 (92,5 %)	Typ-II	Typ-I
M12	6 Wochen	241/110 (45,6 %)	110 (100 %)	Typ-II	
	Mean (± SEM)	26,23 % (± 5,8 %)	91,20 % (± 1,96 %)		

M13	9 Wochen	109/60 (55 %)	27 (45 %)	Typ-II	
M14	9 Wochen	254/64 (25 %)	51 (79,7 %)	Typ-II	9 Typ-I, 4 Typ-II
M15	9 Wochen	270/114 (42,2 %)	84 (73,7 %)	Typ-II	
	Mean (± SEM)	40,8 % (± 10,67 %)	66,1 % (± 13,08 %)		

M17	12 Wochen	159/41 (25,8 %)	10 (24,4 %)	Typ-II	Typ-I
M18	12 Wochen	255/0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
M19	12 Wochen	200/0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
M20	12 Wochen	250/0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
M21	12 Wochen	200/0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
	Mean (± SEM)	8,6 % (± 5,75 %)	8,1 % (± 5,45 %)		

Tabelle 2: Einteilung der Rattenbiopsien nach ihrem Entnahmezeitpunkt sowie Darstellung des Verhältnisses der für den fetalen Acetylcholinrezeptor positiven Zellen zu den insgesamt beurteilten Zellen mit Angabe der *standard error of the mean* sowie Angabe des Anteils fACh-R positiver atropher Zellen an der Gesamtanzahl positiver Zellen und Darstellung der Fasertypisierung der rezeptor-positiven Zellen.

Um die für den fACh-R positiven Zellen genauer zu beurteilen und sie den Fasertypen zuordnen zu können, wurden die nach der ATPase bzw. NADH-Färbung angefertigten Muskelschnitte mit den entsprechenden immunhistologischen Präparaten verglichen. Hierbei zeigte sich ein deutliches Ergebnis, denn nur bei dem Tier mit der Biopsie-Nr. M9 aus der 3. Gruppe, also 6 Wochen nach Ligaturentfernung, fanden sich sowohl atrophe Typ-I und Typ-II-Fasern, die den fACh-R exprimieren, wohingegen bei allen anderen Präparaten nur atrophe Typ-II-Fasern mit Expression des fACh-R gefunden

wurden. Bei den positiven nicht-atrophen Muskelzellen zeigte sich dies genau umgekehrt. Hier war es bis auf eine Ausnahme, Tier mit der Biopsie-Nr. M14 aus der 4. Gruppe, genau umgekehrt, denn die positiven normotrophen bzw. hypertrophen Muskelzellen waren Typ-I Fasern.

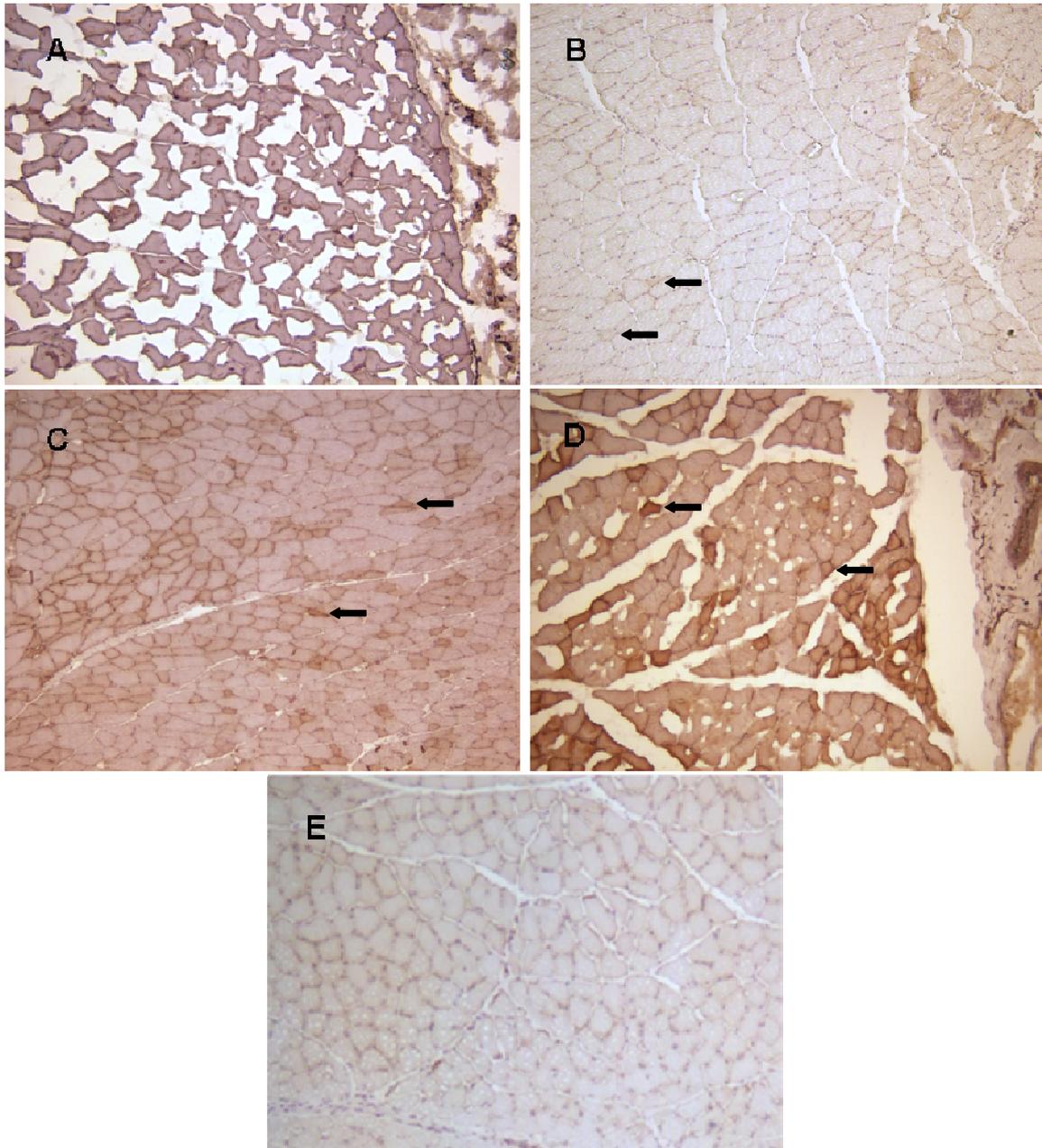


Abbildung 8: Fetale Acetylcholinrezeptor-Ak-Färbungen (Maßstab 100 μ m) von Rattenmuskelquerschnitten. Darstellung der Expression des fACh-R zum Zeitpunkt der Läsionslösung (Bild A), beziehungsweise 3, 6, 9 und 12 Wochen (Bild B bis E) nach Entfernung der Nervenligatur. Die Pfeile in den Bildern B-D markieren für den fACh-R positive atrophe Muskelzellen.

3.2 Ergebnisse der RT-PCR von Rattenmuskulatur

Von den an den fünf Zeitpunkten (Woche 1, 3, 6, 9 und 12 nach Läsion) entnommenen Muskelbiopsien bei der Ratte wurde RNA isoliert, fACh-R-spezifische cDNA synthetisiert und mittels RT-PCR amplifiziert und anschließend die Gelelektrophorese durchgeführt. Im Folgenden sind die repräsentativen Genexpressionsmuster des fACh-R dargestellt. Hierbei zeigt sich eine minimale Expression zum Analysezeitpunkt Woche 1, ein Ansteigen der Genexpression zum Zeitpunkt 3 Wochen nach Entfernen der künstlichen Denervierung mit Erreichen des Maximums der Expression nach 6 Wochen. Hiernach sinkt die Expression nach 9 Wochen wieder deutlich ab und ist nach 12 Wochen nicht mehr beziehungsweise nur noch marginal darzustellen.

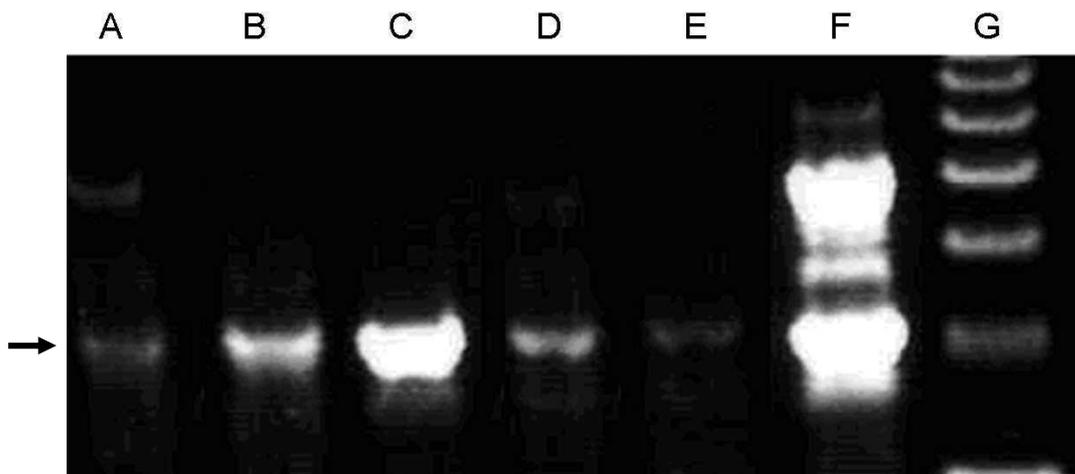


Abbildung 9: Expression des fACh-R-Gens (Bande mit Pfeil markiert) mittels RT-PCR zu den Entnahmezeitpunkten der Rattenmuskelbiopsien am Tag der Läsionslösung (A), beziehungsweise 3 (B), 6 (C), 9 (D) und 12 (E) Wochen später (F: Positivkontrolle; G: Marker).

3.3 Auswertung der Immunhistochemie der Humanmuskulatur

Zunächst soll eine Übersicht über die klinischen Daten der Patienten gegeben werden:

- Patient 1: Die 62-jährige Patientin beklagte ziehende Schmerzen im Bereich der hinteren Oberschenkel seit 20 Jahren, seit 16 Jahren bestand ein allgemeines Schwächegefühl, verbunden mit fieberhaften

Symptomen sowie Gelenk- und Muskelschmerzen. 2 Jahre später war ein Sjögren-Syndrom bei Sicca-Symptomatik diagnostiziert worden. Seit 9 Jahren bestand eine subakut aufgetretene Schwäche der Beine, rechts ausgeprägter als links, welche sich unter schubartigen, fieberhaften Exazerbationen verschlechterte. Bei der klinischen Untersuchung fanden sich eine asymmetrische Tetraparese mit Atrophie und Parese der Oberarmmuskulatur rechts und linksbetonte Paresen der Beine und asymmetrische Sensibilitätsstörungen im Sinne einer Schwerpunktneuropathie. Die Neurophysiologie ergab eine vorwiegend axonale, sensomotorische Schwerpunktneuropathie. Im EMG zeigten sich gemischt neurogen-myopathische Veränderungen mit geringer Spontanaktivität. Die Biopsie des M. vastus lateralis links ergab ein leichtes myopathisches Gewebssyndrom.

In der Zusammenschau der Befunde wurde die Diagnose einer vaskulitischen Polyneuropathie und interstitiellen Myositis bei Mischkollagenose und Sjögren-Syndrom gestellt. Eine Besserung und langfristige Stabilisierung konnte durch eine Steroid-Therapie und eine langfristige Therapie mit Methotrexat erzielt werden.

- Patient 2: Die 67-jährige Patientin hatte vor 2 Jahren Taubheitsgefühl und Schwäche der linken Hand entwickelt, kurze Zeit später kam es zu einer progredienten Fußheberschwäche links und einer Zunahme der Schwäche der linken Hand. Als Vorerkrankungen war ein Diabetes mellitus seit 14 Jahren bekannt. Es fand sich eine links-, bein- und distal betonte Tetraparese mit distalen Muskelatrophien. Neurographisch zeigte sich eine vorwiegend axonale Schwerpunktneuropathie. Im EMG fand sich Spontanaktivität in betroffenen Muskeln des linken Beines und des linken Armes.

Die Muskelbiopsie des M. gastrocnemius links zeigte eine leichtgradige neurogene Muskelatrophie sowie Zeichen einer entzündlichen Gefäßbeteiligung im Sinne einer Perivaskulitis.

Bei Zellzahlerhöhung im Liquor ergab sich die Verdachtsdiagnose einer vaskulitischen Schwerpunkt-Neuropathie.

- Patient 3: Die 80-jährige Patientin hatte seit 9 Monaten eine Schwäche und ausgeprägte Schmerzen sowie Berührungsempfindlichkeit der Extremitäten entwickelt. Es fand sich eine proximal und beinbetonte Tetraparese, Reflexabschwächung an den Beinen, Dysästhesie und Hyperpathie der Beine.

Elektroneurographisch zeigte sich eine mittelschwere axonale Polyneuropathie mit florider Spontanaktivität im EMG.

Die Biopsie des M. vastus lateralis links ergab eine neurogene Muskelatrophie. Da sich in der Biopsie des N. suralis kleinere entzündliche Veränderungen zeigten, wurde die Verdachtsdiagnose einer CIDP gestellt.

- Patient 4: Bei dem 62-jährigen Patient war es seit 6 Jahren zu Lumboischialgien und zu einer zunehmenden Schwäche beider Beine verbunden mit einer Stand- und Gangunsicherheit gekommen. Nach 5 Jahren wurde eine Spinalkanalstenose des Segmentes L3/L4 operiert, wodurch sich die Schmerzen komplett zurückbildeten. Weiterhin bestand eine rechtsbetonte Fußheberschwäche, in den folgenden Monaten trat zudem ein Taubheitsgefühl der Hände auf. In der klinischen Untersuchung zeigte sich eine sensomotorische Polyneuropathie mit Reflexabschwächung und Sensibilitätsstörungen an Armen und Beinen.

Elektroneurographisch fand sich eine axonale, motorisch betonte Polyneuropathie mit florider Denervierungsaktivität und chronisch-neurogenen Veränderungen im EMG.

Die Biopsie des M. tibialis anterior links zeigte eine hochgradig neurogene Muskelatrophie, die Biopsie des N. suralis li. zeigte einen heterogenen Faserverlust und erhebliche gefäßbetonte entzündliche Infiltrate, so dass in der Zusammenschau der Befunde die Diagnose einer vaskulitischen Neuropathie gestellt wurde. Durch eine Steroid- und

Azathioprin-Therapie konnte zunächst keine ausreichende klinische Besserung erzielt werden, so dass eine Cyclophosphamid-Therapie (11 Zyklen) erfolgte. Auch drei Jahre nach dieser Therapie war der Zustand klinisch und neurophysiologisch stabil.

- Patient 5: Bei der 35-jährigen Patientin war es seit 5 Jahren zu einer zunehmenden Fußheberschwäche rechts gekommen. Bei der Untersuchung fanden sich darüber hinaus eine Hypästhesie im Versorgungsgebiet des N. peroneus communis. Neurographisch zeigte sich eine axonale Schädigung des N. peroneus rechts, die übrigen untersuchten Nerven erbrachten unauffällige Befunde. Im EMG fand sich Spontanaktivität nur in der Peroneus-versorgten Muskulatur rechts. Bei den Laboruntersuchungen zeigte sich ein deutlich erhöhter ANA-Titer. Die Biopsie des M. tibialis anterior rechts ergab eine hochgradige neurogene Muskelatrophie sowie entzündliche perivaskuläre Infiltrate, so dass von einer vaskulitischen Polyneuropathie ausgegangen wurde.
- Patient 6: 73-jähriger Patient, 1979 Bandscheiben-Operation LWK 4/5 mit nachfolgender Schwäche der Fußhebung links. Seit einigen Monaten Kraftlosigkeit des linken Fußes und der linksseitigen Unterschenkelmuskulatur. Seit 11/00 Schmerzen im Bereich des linken Mittelfußes und Sprunggelenkes. Zudem bestand seit Jahren ein Taubheits- und Pelzigkeitsgefühl im Bereich der linken Großzehe. Bei der körperlichen Untersuchung zeigte sich ein leichter Fallfuß links, der Fersengang war links nicht möglich, desweiteren distal betonte atrophische Paresen und eine Reflexabschwächung der linken unteren Extremität, zudem eine leichte Beeinträchtigung der Spitz-Stumpfdiskrimination im Bereich des linken Unterschenkels. Elektroneurographisch zeigte sich das Bild einer axonal sensomotorischen Polyneuropathie mit Spontanaktivität und chronisch neurogen veränderter Willküraktivität in Muskeln der unteren Extremität im EMG.

Die Muskelbiopsie des M. tibialis anterior links ergab eine leichtgradige neurogene Muskulatrophy ohne eindeutigen Hinweis auf eine entzündliche Genese. Somit wurde die Diagnose einer axonalen sensomotorischen Polyneuropathie gestellt.

Die Auswertung der Immunhistochemie der Humanmuskulatur (Tab. 3) erfolgte nach den gleichen Kriterien der zuvor erfolgten Analyse der Rattenmuskulatur. Dabei zeigte sich, dass es sich bei allen positiven atrophen Fasern um Typ-II-Fasern handelt und bei allen positiven nicht-atrophen Fasern um Typ-I-Fasern. Zudem findet sich eine Korrelation zwischen der Expression des fetalen Acetylcholinrezeptors zum Schweregrad der Parese des betroffenen biopsierten Muskels. Bei den Patienten 1, 2 und 6 waren die untersuchten Muskeln nur leicht betroffen und es fanden sich nur wenige für den fetalen Acetylcholinrezeptor positive atrophe Muskelzellen in der Antikörperfärbung. Im Gegensatz hierzu war die Expression des fetalen Acetylcholinrezeptors bei der Patientin 3, mit von der neurogenen Erkrankung mittelgradig betroffener Muskulatur, deutlich ausgeprägter. Eine noch stärkere Expression fand sich bei den Patienten mit schwerer neurogener Muskulatrophy (Patient 4 und 5). Hier exprimierten bis zu 53 % der atrophen Zellen den fetalen Acetylcholinrezeptor, in der leicht betroffenen Gruppe hingegen nur bis zu 4,6 % der Zellen und in der mittelgradig betroffenen Gruppe bis zu 8,4 % der Zellen.

<i>Patient</i>	<i>Anzahl beurteilter Zellen / fACh-R positive Zellen</i>	<i>Anteil fACh-R positiver atropher Zellen an den beurteilten Zellen</i>	<i>Fasertypisierung positiver atropher Fasern</i>	<i>Fasertypisierung positiver nicht- atropher Fasern</i>
1	350/ 4	4/ 1,14 %	Typ-II	
2	300/ 54	5/ 1,6 %	Typ-II	Typ-I
3	250/ 81	21/ 8,4 %	Typ-II	Typ-I
4	161/ 72	69/ 42,85 %	Typ-II	Typ-I
5	51/ 40	27/ 52,9 %	Typ-II	Typ-I
6	150/ 7	7/ 4,6 %	Typ-II	

Tabelle 3: Auflistung der Humanbiopsien, des Verhältnisses Rezeptor positiver Zellen zu den Zellen gesamt sowie deren Unterteilung in atrophe und nicht-atrophe Muskelfasern mit Angabe der jeweiligen Fasertypisierung.

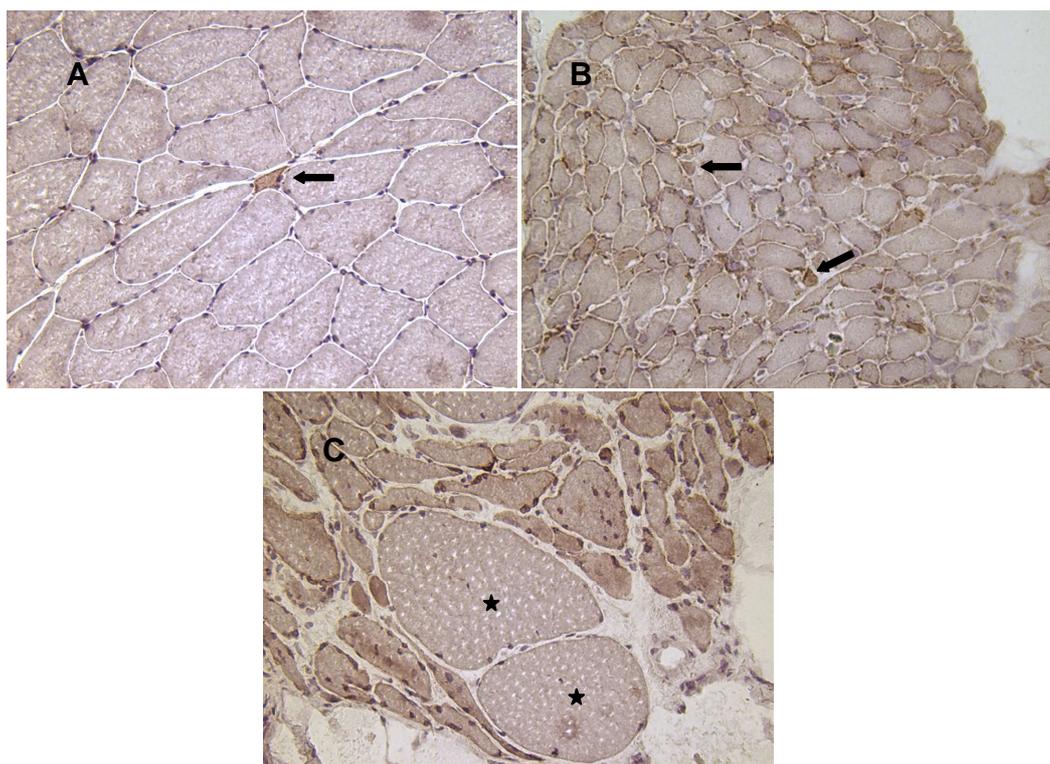


Abbildung 10: Fetale Acetylcholinrezeptor-Ak-Färbung von Humanmuskelquerschnitten bei (A) leichtgradiger vaskulitischer Polyneuropathie und interstitieller Myositis bei Mischkollagenose und Sjögren- Syndrom (Patient 1, Maßstab 50 µm), (B) mittelschwerer axonaler Polyneuropathie (Patient 3, Maßstab 100 µm) und (C) schwerer vaskulitischer Polyneuropathie (Patient 4, Maßstab 50 µm). Eine positive Anfärbung ist durch die bräunliche Anfärbung der

Zellmembran angezeigt. Die Pfeile in den Bildern A und B weisen auf für den fetalen ACh-R positive atrophe Zellen. Die Sterne in Bild C liegen in zwei (pseudo-) hypertrophen negativen Muskelzellen, die von einer Gruppe positiver atropher Zellen umgeben sind.

3.4 Vergleich der Ergebnisse der Untersuchungen der Ratten- und Humanmuskulatur

Die vorliegenden Human- und Tiermuskelpräparate wurden nach den gleichen Konservierungs- und Färbepinzipien behandelt. Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigten sich die folgenden Befunde:

In Korrelation zum Ausmaß der Denervierung kam es zur Expression des fACh-R. Bei der experimentellen Läsion, bei der eine Reinnervation erfolgte, bildete sich diese Expression mit der Reinnervation zurück. Des weiteren entwickelte sich eine Atrophie vieler Muskelfasern, was bei dem chronischen Prozess bei den Patienten in deutlich stärkerem Ausmaß zu beobachten war. Ferner fiel auf, dass sowohl bei den Biopsien von Patienten mit chronisch-neurogenen Muskelerkrankungen als auch bei der experimentell gesetzten Nervenläsion im Rattenexperiment eine Expression des fACh-R bei atrophierten Muskelzellen hauptsächlich bei den Typ-II-Muskelfasern vorlag. Normotrophe beziehungsweise (pseudo-)hypertrophe Muskelzellen, die eine Expression des fACh-R zeigten, wiesen im Gegensatz zu den atrophierten Myozyten den Typ-I-Muskelfaser-Phänotyp auf.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression des fACh-Rezeptors während der Degeneration beziehungsweise Regeneration der Muskelzellen nach experimenteller Nervenläsion und anschließender Nervenregeneration zu untersuchen. Die axonale Nervenläsion erfolgte durch eine feste Ligatur des Nerven für den Zeitraum von einer Woche. In vorausgegangenen Studien wurde der Nerv dagegen durchtrennt (Ma et al., 2007), oder es wurde ein Kälteschaden gesetzt. Im hier verwendeten Modell sollte die Regeneration des Nerven ermöglicht werden, um die Reaktion der Muskulatur auf die akute, künstlich herbeigeführte Denervierung und die im Verlauf, nach Lösen der Ligatur, wieder erfolgte Reinnervation darzustellen. Dabei sollte der Zeitverlauf der Expression des fACh-R näher untersucht werden, um den Zusammenhang mit axonaler Schädigung und Regeneration zu beurteilen.

Zur klinischen Einschätzung der Ergebnisse wurden Muskelbiopsien von sechs Patienten mit histologisch gesicherter, im Schweregrad unterschiedlich ausgeprägter neurogener Muskelerkrankung untersucht.

Zur Analyse auf RNA-, Protein- bzw. histologischer Ebene wurden von allen Biopsiepräparaten sowohl eine RT-PCR, als auch eine für den fACh-R spezifische Antikörperfärbung und Färbungen zur Fasertypisierung angefertigt.

Wie auch schon aus vorherigen tierexperimentellen Studien bekannt, ergab sich auch in dieser Arbeit ein Ansteigen der Expression und Erreichen des Höhepunktes des fACh-R bei atrophen Muskelzellen in der 6. Woche nach axonaler Läsion (Fischer et al, 1999). Während jedoch in den vorausgegangenen Studien irreversible Nervenläsionen wie Transsektion oder Kryoläsion verwendet wurden, konnte hier der weitere Verlauf bei axonaler Regeneration des Nerven untersucht werden. Mit erfolgreicher Regeneration war die Expression wieder deutlich rückläufig und es fand sich 9 Wochen nach Beendigung der künstlichen Denervierung ein deutliches Absinken der Expression des fACh-R bei atrophen Muskelzellen. In der am längsten nachverfolgten Gruppe 5 (12 Wochen nach Entfernen der Ligatur) war die

Expression des fACh-R nur noch sporadisch nachweisbar, so dass, wie aus der Literatur bekannt, die Expression des fACh-R nach rascher Reinnervation auf das Ausgangsniveau bei gesunder Muskulatur des Erwachsenen zurückgeht (Fischer et al, 1999). Dies lässt also eine Rolle des fetalen Acetylcholinrezeptors beim Aufbau der motorischen Endplatte vermuten, die im Falle einer Regeneration nach Nervenläsion offensichtlich nach ähnlichen Mustern abläuft wie in der embryonalen und fetalen Entwicklung.

Bei den untersuchten Rattenmuskelbiopsien wie auch bei den humanen Muskelbiopsiepräparaten zeigte sich, dass die atrophen Muskelfasern bis auf wenige Ausnahmen schnelle Typ-II-Fasern waren. Bei den normotrophen beziehungsweise hypertrophierten Muskelzellen, die eine Expression des fACh-R aufwiesen, fand sich im Gegensatz zu den atrophierten Myozyten der Typ-I-Muskelfaser-Phänotyp. Dies stimmt mit vorangegangenen Studien überein, welche nachwiesen, dass Typ-I Fasern im Rahmen einer akuten Denervierung weniger von einer Atrophie betroffen sind als die Typ-II-Fasern (Ashley et al, 2006). Als mögliche Ursache hierfür dürften die unterschiedlichen Stoffwechselfvorgänge und Energiereserven anzusehen sein.

In der Patientengruppe waren drei leicht, eine Patientin mittelgradig sowie zwei Patienten schwer von der zugrundeliegenden neurogenen Erkrankung betroffen. In der Auswertung der Immunhistochemie zeigte sich eine direkte Korrelation des Schweregrades der neurogenen Muskelerkrankung zur Expression des fetalen Acetylcholinrezeptors bei atrophen Muskelzellen. So waren bei den von der neurogenen Erkrankung nur leicht betroffenen Patienten nur ca. 2% der beurteilten Muskelzellen für den fetalen Acetylcholinrezeptor positive atrophe Myozyten. Jedoch bei den schwer betroffenen Patienten waren dies fast 50%. Dies zeigt also eindrücklich, wie stark die Expression des fACh-R mit dem Schweregrad der neurogenen Erkrankung zusammenhängt. Auch die Fasertypisierung der positiven atrophen Muskelzellen ergab ein eindeutiges Ergebnis, denn es fanden sich ausschließlich atrophe Typ-II-Fasern mit positiver Expression. Für den fACh-R positive atrophe Myozyten mit dem Typ-I-

Phänotyp konnten in dieser Untersuchung im Gegensatz zu den Befunden von Gattenlöhner et al. (2002) nicht nachgewiesen werden. Eine Ursache für die bei den hier untersuchten Patienten gefundene Expression des fACh-R in atrophen Typ II-Fasern könnte die bei einem Teil der Patienten bereits vor der Biopsie erfolgte Therapie mit Glukokortikosteroiden sein. Denn wie zum einen Erfahrungswerte aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg zeigen und zum anderen aus der Literatur bekannt ist (Braun et al 1993), führt eine Therapie mit Glukokortikosteroiden zur überschießenden Expression des Acetylcholinrezeptors. Zudem standen Gattenlöhner und Kollegen eine deutlich heterogeneres, größeres Patientenkollektiv zur Verfügung. So untersuchten sie sowohl Patienten mit neurogenen Muskelschädigungen wie Neuropathien oder Motoneuronenerkrankungen als auch mit entzündlichen und nicht-entzündlichen Muskelerkrankungen. Natürlich muss auch berücksichtigt werden, welcher Muskel an welcher Stelle biopsiert wird und damit, welcher Muskelfasertyp hier dominiert.

Im Tierexperiment wurde ebenfalls eine Expression des fACh-R in atrophen Typ II-Fasern gefunden. Im Gegensatz zu den Patienten handelt es sich hier um eine akute axonale Schädigung, in deren Rahmen es zu anderen Reaktionsmustern kommen kann. Zudem hatten Ashley und Kollegen 2007 gezeigt, dass die Reaktion der Muskelzellen auf eine akute Denervierung sich bei verschiedenen Spezies unterscheiden kann. Weiterhin fanden sie heraus, dass die neurogene Muskelatrophie bei Kaninchen dem Erscheinungsbild der Muskulatur bei Patienten mit neuromuskulären Erkrankungen mehr ähnelt als bei Ratten. Dies könnte also eine weitere mögliche Erklärung für das in dieser Arbeit gefundene unterschiedliche Expressionsmuster bei der Ratten- und Humanmuskulatur sein. Des Weiteren führt eine akute Schädigung schneller und zu Beginn hauptsächlich zur Atrophie der Typ-II-Fasern, wohingegen Typ-I-Fasern im Rahmen des akuten Geschehens kaum atrophieren. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die bereits diskutierten unterschiedlichen Stoffwechselforgänge und Energiereserven sein. Im Rahmen der erfolgreichen

Reinnervation geht die Expression des fACh-R rasch zurück, analog bildet sich die Atrophie der Muskelzelle zurück.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte also die Reaktion der Muskelzelle auf eine akute Denervierung und anschließend erfolgter Reinnervation sowie in diesem Zusammenhang die Expression des fACh-R dargestellt werden. Anhand der Ergebnisse lassen sich Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß der Expression des fACh-R und dem Denervierungs- beziehungsweise Reinnervationsverlauf ziehen. Es konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Reinnervation, also circa 6 Wochen nach Beginn der Regeneration, das Maximum der Expression erreicht wurde und mit zunehmender Nervenregeneration und wieder erfolgter Innervation der Muskulatur diese sich sowohl zellmorphologisch erholt als auch die Expression des fACh-R rückläufig beziehungsweise nicht mehr nachweisbar ist.

Bei den humanen Biopsien zeigte sich, dass die Expressionen des fACh-R mit dem Schweregrad der neurogenen Muskelatrophie korreliert, mit entsprechend geringer Expression bei leichtgradig betroffenen und deutlicher Expression bei von der neurogenen Erkrankung schwer betroffenen Patienten.

5. Zusammenfassung

In der Muskulatur eines gesunden Erwachsenen kommt der Acetylcholinreceptor hauptsächlich im Bereich der motorischen Endplatte vor und besteht aus zwei Alpha-, einer Beta-, einer Delta- und einer Epsilon-Untereinheit (Changeux et al., 1992). Wie schon in vorhergehenden tierexperimentellen Studien gezeigt, kommt es nach Durchtrennung bzw. Quetschung eines peripheren Nerven zu einer deutlichen Zunahme der Expression der fetalen Form des Acetylcholinrezeptores. Hierbei ist die Epsilon-Untereinheit gegen eine Gamma-Untereinheit (Mishina et al 1985; Witzmann et al., 1987) ausgetauscht. Bei Patienten mit neurogener Muskelatrophie konnte gezeigt werden, dass es in atrophen Muskelfasern zu einer Expression der Gamma-Untereinheit kommt (Gattenlöhner et al., 2002).

In dieser Arbeit wurden Muskelbiopsien von 6 Patienten mit histologisch gesicherter neurogener Muskelerkrankung und aus dem durchgeführten Tierexperiment stammendes Biopsiematerial untersucht. Mittels der tierexperimentellen Studie sollte die Expression des fACh-R während der Degeneration bzw. Regeneration der Muskelzelle nach experimenteller Ligatur des N. ischiadicus untersucht werden. Es wurden sowohl vom humanen als auch vom tierexperimentell gewonnenen Biopsiematerial RT-PCR, Färbungen zur Fasertypisierung (NADH- und ATPase-Färbung) sowie die Immunhistochemie für den fACh-R angefertigt.

Die histologische Analyse der Rattenmuskelbiopsien zeigte einen starken Anstieg der Expression des fACh-R nach axonaler Nervenläsion mit Maximum nach 6 Wochen. Dabei wurde der fACh-R vorwiegend in atrophen Typ-II-Fasern exprimiert. Sowohl histologisch als auch auf Genexpressionsebene zeigte sich der gleiche zeitliche Verlauf der Expression des fACh-R mit langsamem Anstieg, Erreichen des Maximums der Expression nach 6 Wochen sowie nur noch marginaler Expression am Ende des Untersuchungszeitraumes.

Auch bei der Auswertung der Humanmuskelbiopsien waren die atrophierten, für den fACh-R positiven Muskelfasern Typ-II-Fasern. Zudem fand sich eine

Korrelation zwischen dem Schweregrad der vorliegenden Erkrankung und der Expression des fACh-R.

6. Literaturverzeichnis:

Ashley Z, Sutherland H, Lanmüller H, Russold M F, Unger E, Bijak M, Mayr W, Boncompagni S, Protasi F, Salmons S, Jarvis J C. Atrophy, but not necrosis, in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year. *AmJ Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C440-C451

Adams L, Carlson BM, Henderson L, Goldmann D. Adaption of nicotinic acetylcholine receptor, myogenin, and MRF4 gene expression to long-term muscle denervation. *J Cell Biol* 1995; 131:1341-1349

Böcker W, Denk H, Heitz PU. Pathologie. Urban & Schwarzenberg, München, 1997

Braun S, Askansas V, Engel WK, Ibrahim E. Long-term treatment with glucocorticoids increases synthesis and stability of junctional acetylcholine receptors on innervated cultured human muscle. *J Neurochem* 1993; 60: 1929-1935

Changeux JP. Functional organisation of the nicotinic acetylcholine receptor. *C R Acad Sci III* 1992; 314:89-94

Changeux JP, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Bertrand D. The functional architecture of the acetylcholine nicotinic receptor explored by affinity labelling and site-directed mutagenesis. *Q Rev Biophys* 1992; 25:395-432

Corriveau RA, Romano SJ, Conroy WG, Oliva L, Berg DK. Expression of neuronal acetylcholine receptor genes in vertebrate skeletal muscle during development. *J Neurosci* 1995; 15: 1372-1383

Fischer U, Reinhardt S, Albuquerque EX, Maelicke A. Expression of functional alpha7 nicotinic acetylcholine receptor during mammalian muscle development and denervation. *Eur J Neurosci* 1999; 11:2856-2864

Gattenlöhner S, Dockhorn-Dworniczak B, Leuschner I, Vincent A, Müller-Hermelink, Marx A. A comparison of MyoD1 and fetal acetylcholine receptor expression in childhood tumors and normal tissues: implications for the molecular diagnosis of minimal disease in rhabdomyosarcomas. *J Mol Diagn* 1999; 1:23-31

Gattenlöhner S, Vincent A, Leuschner I, Tzartos S, Müller-Hermelink HK, Kirchner T, Marx A. The foetal form of the acetylcholine receptor distinguishes rhabdomyosarcomas from other childhood tumors. *Am J Pathol* 1998; 152:437-444

Gattenlöhner S, Schneider C, Thamer C, Klein R, Roggendorf W, Gohlke F, Niethammer C, Czub S, Vincent A, Müller-Hermelink HK, Marx A. Expression of the foetal type acetylcholine receptor is restricted to type 1 muscle fibers in human neuromuscular disorders. *Brain* 2002; 125:1309-1319

Gencik M, Epplen JT, Mortier W. Diagnostik neuromuskulärer Erkrankungen: Fortschritte mit molekulargenetischen Techniken. *Dtsch Med Wochenschr* 1999; 124:85-87

Hall ZW, Sanes JR. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell* 1993; 72 Suppl:99-121

Hara H, Hayashi K, Ohta K, Itho N, Ohta M. Nicotinic acetylcholine receptor mRNAs in myasthenic thymuses: association with intrathymic pathogenesis of myasthenia gravis. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194:1269-1275

Horton RM, Manfredi AA, Conti-Tronconi BM. The embryonic gamma subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is expressed in adult extraocular muscle. *Neurology* 1993; 43:983-986

Kaminski HJ, Kusner LL, Block CH. Expression of acetylcholine receptor isoforms at extraocular muscle endplates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:345-51

Ma J, Shen J, Garrett JP, Lee CA, Li Z, Elsaidi GA, Ritting A, Hick J, Tan KH, Smith TL, Smith BP, Koman LA. Gene expression of myogenic regulatory factors, nicotinic acetylcholine receptor subunits, and GAP-43 in skeletal muscle following denervation in a rat model. *J Orthop Res* 2007; 25:1498-505

MacLennan C, Beeson D, Buijs AM, Vincent A, Newsom–Davis J. Acetylcholine receptor expression in human extraocular muscles and their susceptibility to myasthenia gravis. *Ann Neurol* 1997; 47:423-31

Marx A, Kirchner T, Hoppe F, O`Connor R, Schalke B, Tzartos S, Müller-Hermelink HK. Proteins with epitopes of the acetylcholine receptor in epithelial cell cultures of thymomas in myasthenia gravis. *Am J Pathol.* 1989; 134:865-877

McArdle WD, Katch FI, Katch V. *Exercise Physiology. Energy, nutrition and human performance.* 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001

Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S, Methfessel C, Sakmann B. Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 1985; 312: 406-411

Romano SJ, Pugh PC, McIntosh JM, Berg DK. Neuronal-type acetylcholine receptors and regulation of alpha-7 gene expression in vertebrate skeletal muscle. *J Neurobiol* 1997; 32: 69-80

Silbernagl S, Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2003

Thomas C. Histopathologie. Schattauer, Stuttgart, New York, 1998

Tsujihata M, Ito H, Satho A, Yoshimura T, Motomura M, Nakamura T. Semiquantitative measurement of acetylcholine receptor at the motor end-plate in myasthenia gravis. *Intern Med* 2001; 40:376-381

Vincent A, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor antibody characteristics in myasthenia gravis.I. Patients with generalized myasthenia or disease restricted to ocular muscles. *Clin Exp Immunol* 1982; 49:257-265

Witzmann V, Barg B, Nishikawa Y, Sakmann B, Numa S. Differential regulation of muscle acetylcholine receptor gamma- and epsilon-subunit mRNAs. *FEBS Lett* 1987; 223:104-112

DANKSAGUNG

Mein großer Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Karlheinz Reiners, meinem Doktorvater, für die Möglichkeit diese Arbeit durchführen können zu dürfen.

Meinen herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Stefan Gattenlöhner für die Bereitstellung der Materialien zur Antikörperfärbung und zur Herstellung der RT-PCR sowie für die Übernahme des Koreferates.

Für die Bereitstellung der Humanmuskelbiopsien und der Materialien zur Anfertigung Fasertypisierungsfärbungen sei Herrn Prof. Dr. med. Klaus V. Toyka gedankt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Carsten Wessig für die fortwährende engagierte Betreuung bei der Durchführung des praktischen und theoretischen Teils dieser Arbeit. Bei Problemen jeder Art stand er mir mit tatkräftiger Unterstützung und wertvollen Ratschlägen zur Seite und konnte mich immer wieder neu motivieren und begeistern. Seine stete Motivation trug maßgeblich zu dieser Arbeit bei.

Weiterhin sei allen Mitarbeitern des Labors der Neurologischen Klinik und des Pathologischen Institutes der Universität Würzburg für die Einführung in die Geräte und Techniken sowie für die Hilfestellung bei auftretenden Problemen gedankt.

Mein innigster Dank gilt jedoch meinen Eltern, meinen Brüdern Carsten und Kai und meinem Lars, ohne deren Unterstützung, Fürsorge und Geduld diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

LEBENS LAUF

Name: Fischer
Vornamen: Cindy Erika Elisabeth
Geburtsdatum: 17.09.1977
Geburtsort: Würzburg
Schulischer Werdegang: 1984-1988 Grundschule, Leinach
1988-1997 Friedrich-Koenig-Gymnasium,
Würzburg
Allgemeine Hochschulreife: 6/1997
Studium der Humanmedizin: 5/98-9/98 Ludwig-Maximilians-Universität,
München
10/98-11/04 Julius-Maximilians-Universität,
Würzburg
3. Staatsexamen: 24.11.2004
Assistenzärztin: seit 1/2005 Leopoldina Krankenhaus der Stadt
Schweinfurt, Medizinische Klinik I
(Chefarzt Prof. Dr. H. Seggewiß)

Leinach, im November 2008



Cindy Erika Elisabeth Fischer