

Morphologische Veränderungen bei Muskelbiopsien von Patienten mit kindlichem Morbus Pompe vor und unter Enzymersatztherapie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Ann-Kathrin Kaiser geb. Prölb

aus Neustadt an der Weinstraße

Gießen 2015

Aus dem
Institut für Neuropathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter des Instituts: Herr Prof. Dr. med. Till Acker

Gutachter: Prof. Dr. T. Acker

Gutachter: Prof. Dr. R. Schäffer

Tag der Disputation: 11.05.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lysosomale Speicherkrankheiten und Glykogenosen	1
1.2	Glykogenose Typ II (Morbus Pompe)	3
1.2.1	Geschichte	3
1.2.2	Pathogenese	3
1.2.3	Verlaufsformen und Klinik	4
1.2.4	Vererbung und Inzidenz	7
1.2.5	Diagnostik	8
1.2.6	Therapie.....	14
2	Zielsetzung der Arbeit	19
3	Material und Methoden.....	20
3.1	Materialgewinnung	20
3.2	Gewebeverarbeitung	21
3.2.1	Kryostatschnitte.....	22
3.2.2	Paraffinschnitte	22
3.2.3	Kunstharzeinbettung (Semidünnschnitte)	22
3.3	Vorversuche (Färbeverfahren)	23
3.3.1	PAS-Färbung an Kryostatschnitten und Paraffinschnitten	23
3.3.2	Versuche zu Unterdrückung der unspezifischen PAS-Färbung	25
3.3.3	Kontraststeigerung durch unterschiedliche Gegenfärbungen	27
3.3.4	PAS-Färbung an Semi-Dünnschnitten.....	28
3.4	Quantifizierung der pathologischen Veränderungen und der Glykogenablagerungen in den Muskelfasern	30
3.4.1	Quantitative Analyse der pathologischen Veränderungen der Muskelfasern (MA1 und MA2)	31
3.4.2	Quantitative Analyse der Glykogenablagerungen und leeren Vakuolen in den Muskelfasern (MA3).....	37
3.4.3	Etablierung eines morphologischen Index der pathologischen Veränderungen in den Skelettmuskelfasern für die Analysemethode MA1 und MA2	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Ergebnisse der morphologischen Auswertung der pathologischen Veränderungen der Muskelbiopsien (Färbemethoden)	41
4.2	Ergebnisse der morphologischen Analysemethoden (MA1-MA3)	42
4.2.1	Vergleich der Analysemethoden MA1 und MA2 an Kryostat- und Semidünnschnitten	42
4.2.2	Vergleich der Analyse der Glykogenablagerungen und leeren Vakuolen (MA3) an Kryostat- und Semidünnschnitten	46
4.3	Morphologische Veränderungen von Muskelbiopsien der Patienten mit Morbus Pompe mit unterschiedlichem Ansprechen auf die Enzymersatztherapie (ERT)	48

4.3.1	Einzelfallvorstellungen der untersuchten Muskelbiopsien der Patienten mit Morbus Pompe	49
4.4	Ergebnisse der morphologischen Veränderungen der Muskelbiopsien von kindlichen Patienten mit Morbus Pompe und der Kontrollgruppe	59
4.5	Morphologische Veränderungen initialer Muskelbiopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit infantiler oder juveniler Verlaufsform	61
4.6	Morphologische Veränderungen der Biopsien <u>vor</u> ERT in Abhängigkeit vom klinischen Ansprechen (Response).....	65
4.7	Morphologische Veränderungen der Muskelbiopsien <u>unter</u> ERT in Abhängigkeit vom klinischen Ansprechen (Response).....	70
4.8	Morphologische Veränderungen der 5 Rebiopsien unter ERT	75
4.9	Korrelation der Mo-Indizes der initialen Biopsien mit verschiedenen klinischen Parametern.....	77
4.10	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	82
5	Diskussion.....	84
5.1	Enzymersatztherapie (ERT)	84
5.2	Klassifizierung der morphologischen Veränderungen der untersuchten Muskelbiopsien.....	86
5.3	Korrelation der morphologischen Veränderungen mit dem Ansprechen auf die ERT.	88
5.4	Morphometrische Analyseverfahren bei anderen lysosomalen Speichererkrankungen.....	91
6	Zusammenfassung.....	93
7	Summary.....	95
8	Abkürzungsverzeichnis.....	96
9	Abbildungsverzeichnis.....	97
10	Tabellenverzeichnis.....	101
11	Literaturverzeichnis	103
12	Anhang.....	110
12.1	Rezepte	110
12.1.1	Rezepte für Paraffinschnitte	110
12.1.2	Rezepte für Kryostatschnitte	111
12.1.3	Rezepte für Semidünnschnitte	112
12.1.4	Rezepte Gegenfärbungen	113
12.1.5	Dimedon und Diastasebehandlung.....	114
12.2	Substanz- und Geräteliste	115
12.3	Poster 1	116
12.4	Poster 2	117
12.5	Einverständniserklärung der Patienten zur Untersuchung des Gewebes für wissenschaftliche Zwecke	118

13	Publikationsverzeichnis	119
14	Ehrenwörtliche Erklärung	120
15	Danksagung	121

1 Einleitung

In der folgenden Einleitung soll ein Überblick über lysosomale Speicherkrankheiten und Glykogenosen und besonders über die Glykogenose Typ II, Morbus Pompe, gegeben werden. Anschließend wird genauer auf die Geschichte, Pathogenese, die Verlaufsformen und klinischen Symptome, Diagnostik und Therapie eingegangen.

1.1 Lysosomale Speicherkrankheiten und Glykogenosen

Lysosomale Speicherkrankheiten sind eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, bei denen sich in den Lysosomen Stoffe pathologisch ablagern. Meist sind defekte Enzyme Ursache für den fehlenden Abbau und die Akkumulation führt zu einem Funktionsverlust der Zellen und zu klinischen Symptomen. Abhängig von dem abgelagerten Produkt werden die Krankheiten in Mukopolysaccharidosen, Mukolipidosen und Glykogenosen eingeteilt. Als Glykogenosen werden Krankheiten bezeichnet, deren Pathogenese auf unterschiedlichen Enzymdefekten innerhalb des Glykogen- und Glukosestoffwechsels beruhen. Sie werden auf Grund der dadurch verstärkt anfallenden Glykogenansammlungen in den Zellen auch als Glykogen-Speicherkrankheiten bezeichnet (Hirschorn et al., 2001).

Glukose ist wichtig für den Energiestoffwechsel des Menschen, da durch den Glukoseabbau in Skelett- und Herzmuskulatur Energie freigesetzt wird. Glykogen ist die Speicherform von Glukose im menschlichen Organismus. Es wird vor allem in zwei Organen gespeichert: in der Leber und im Skelettmuskel. Von dort wird es zur Aufrechterhaltung des Blutglukosespiegels verwendet und für den Bedarf der Skelett- und Herzmuskulatur gespeichert (Rassow et al., 2008). Somit kommt es bei Glykogenspeicherkrankheiten vor allem in der Skelett- und Herzmuskulatur und in der Leber zu pathologischen Glykogenansammlungen und die Organe sind in ihrer Funktion eingeschränkt (Schöpfer et al., 2011).

Die folgende Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die Glykogensynthese:

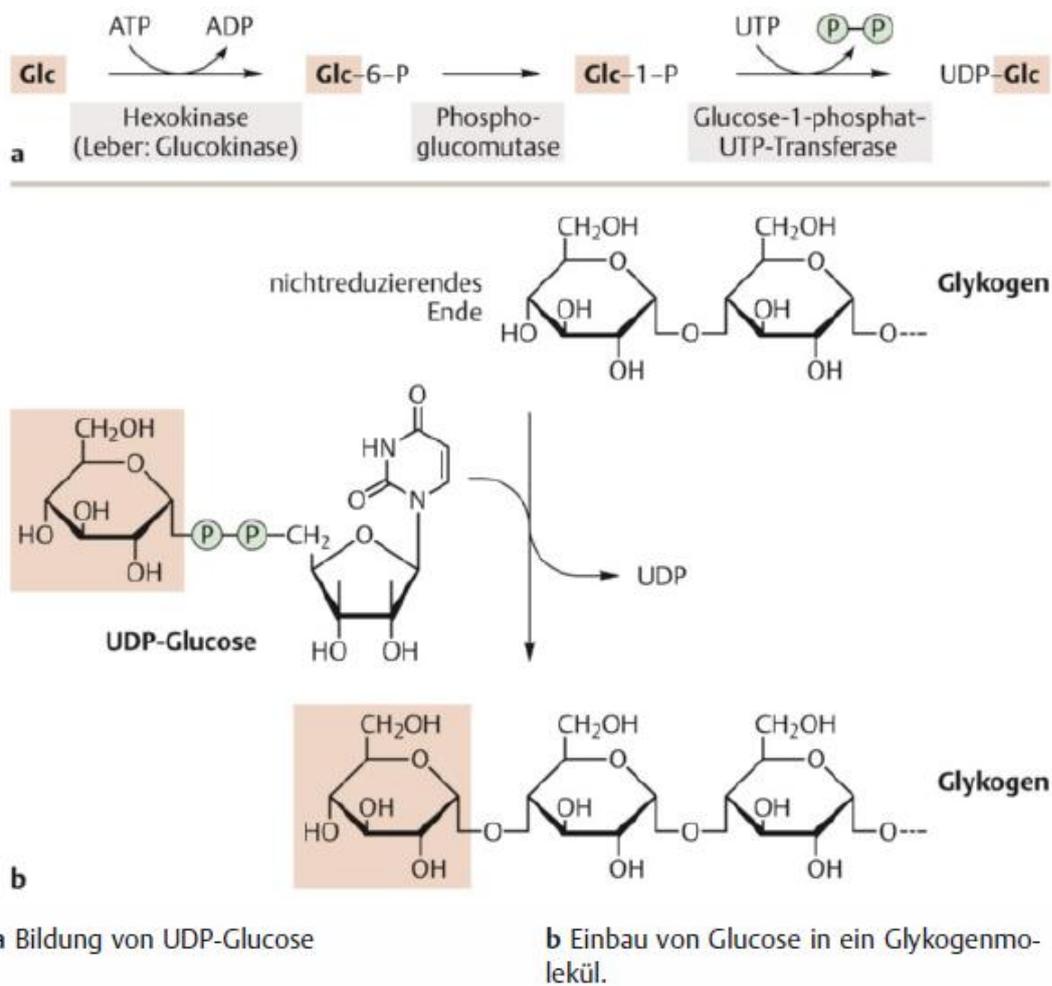


Abbildung 1: Übersicht Glykogensynthese (Rassow et al., 2008)

Die Glykosenosen werden nach den beteiligten Enzymen eingeteilt (Tabelle 1):

Typ	Enzymdefekt	betroffene Organe
I von Gierke	Glucose-6-Phosphatase	Leber, Niere
II Pompe	infantil, juvenil adult	Alpha-1,4-Glucosidase Skelettmuskel, Herz, zentrales Nervensystem, peripheres Nervensystem Skelettmuskel
III Forbes, Cori	III a III b III c III d	Amylo-1,6-Glucosidase mit der 1,4-Glucotransferase und der Amylo-1,6-Glucosidase Aktivität Skelettmuskel, Leber Leber Skelettmuskel Skelettmuskel, Leber
IV Andersen	Amylo-1,4-1,6-Transglucosidase	Skelettmuskel, Leber
V Mc Ardle	Muskel-Phosphorylase	Skelettmuskel
VI Hers	Leber-Phosphorylase	Leber
VII Tarui	Phosphofruktokinase	Skelettmuskel, Erythrozyten
VIII	Phosphorylase-b-Kinase	Leber, Skelettmuskel, Herz
IX	Phosphoglyceratkinase	Skelettmuskel, Nervensystem, Erythrozyten
X	Phosphoglyceratmutase	Skelettmuskel
XI	Lactatdehydrogenase	Skelettmuskel, Haut, Uterus

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Glykosenosen (modifiziert nach Zierz et al., 2003)

1.2 Glykogenose Typ II (Morbus Pompe)

Bei der Glykogenose Typ II (Morbus Pompe) fehlt das lysosomale Enzym α -1,4-Glucosidase (saure Maltase oder „saure α -Glucosidase“ (GAA)). Es kommt zur pathologischen Glykogenablagerung zunächst in den Lysosomen der Zelle und im weiteren Verlauf in der gesamten Zelle mit Funktionsverlust der Zelle.

1.2.1 Geschichte

Die Glykogenspeicherkrankheit Typ II wurde erstmals 1932 von dem niederländischen Pathologen Dr. J. C. Pompe beschrieben und wird daher nach ihrem Erstbeschreiber Morbus Pompe benannt. Der Arzt entdeckte bei der Obduktion eines 8-monatigen Mädchens im Lichtmikroskop eine enorme Glykogenansammlung in Herz- und Skelettmuskelzellen. Er beschrieb diesen Fall daraufhin in seiner Publikation „Overidiopathische hypertrophie van het hart“. Das Mädchen verstarb an einer kardialen Myopathie (Di Rocco et al., 2007; Fernandes, 1995; Pompe, 1932). Bei dieser Erkrankung kommt es auch in anderen Organen wie Leber, Niere und Nervengewebe zu einer pathologischen Anhäufung von Glykogen. Diese Ansammlung führt klinisch zu einer Muskelhypotonie, Hepatomegalie, Makroglossie und Kardiomegalie. Die Erstbeschreibung von J.C. Pompe zeigt ein Kind mit einer infantilen Verlaufsform, bei der die ausgeprägte Kardiomyopathie im Vordergrund steht und zum Tod der Patienten führt (Hirschorn et al., 2001). Der Enzymdefekt als Ursache der Erkrankung wurde im Jahr 1963 erstmalig von H.G. Hers beschrieben (Fernandes, 1995; Hers, 1963).

1.2.2 Pathogenese

In der Zelle wird Glykogen zur kurzfristigen Energiegewinnung genutzt. Durch Autophagosomen wird das Glykogen in die Lysosomen befördert, in denen es dann durch die saure α -Glucosidase (GAA) hydrolysiert und in Glukose umgewandelt wird. Die Glukosemoleküle können, im Gegensatz zu Glykogen, das Lysosom und die Zelle verlassen. Bei einem Mangel des umwandelnden Enzyms (GAA), kommt es zu einer Anhäufung an intralysosomalem Glykogen und so zur Funktionseinschränkung der betroffenen Zellen. Durch die Glykogenansammlung kommt es zur Volumenzunahme der Lysosome mit Verdrängung anderer Strukturen, dann zur Ruptur und Zellschädigung durch die freigesetzten Abbauenzyme (Abbildung 2). Besonders in den Skelettmuskel- und Herzmuskelfasern und im Lebergewebe kommt es zur verstärkten Anhäufung des Glykogens. Dies führt zu einem kontinuierlichen Verlust an Muskelzellen und zu einem progredient verlaufenden Muskelfunktionsverlust der Skelettmuskeln, einer kardialen Hypertrophie mit Funktionseinschränkung des Herzens und einer Hepatomegalie. Bei infantilen Verlaufsformen ist das betroffene Enzym, die saure α -Glucosidase (GAA), nicht nachweisbar. Bei den late-onset Verlaufsformen besteht dagegen eine Restaktivität des Enzyms. Diese Restaktivität kann zwischen 0-40% liegen (Hirschorn et al., 2001).

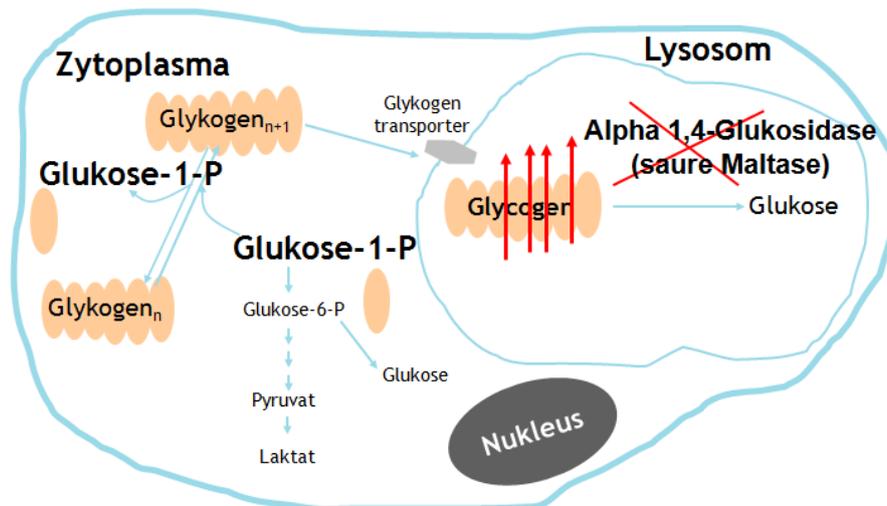


Abbildung 2: Pathologie der Glykogenspeicherkrankheit Typ II (modifiziert nach Genzyme, 2005)

1.2.3 Verlaufsformen und Klinik

Die Glykogenspeicherkrankheit Typ II kann klinisch unterschiedliche Phänotypen zeigen. Sie wird je nach Erkrankungsalter und klinischem Bild in 3 Formen unterteilt: die infantile, die juvenile und die adulte Form, wobei die juvenile und die adulte Form in der aktuellen Literatur als late-onset Form zusammengefasst werden (Kishnani et al., 2012). Die Verlaufsformen unterscheiden sich durch den Beginn der Erkrankung, die Restaktivität der GAA sowie eine unterschiedlich starke Beteiligung der Organe (z.B. Aussparung der Herzmuskulatur), der variablen Geschwindigkeit des Voranschreitens der Krankheit und der Letalitätsrate (Hirschorn et al., 2001; Kishnani et al., 2006).

Hirschhorn hat in einer Studie aus dem Jahr 2001 die unterschiedlichen Formen von Morbus Pompe und das klinische Erscheinungsbild verglichen (Tabelle 2):

Klinik	Infantile Form (n=78)	Juvenile Form (n=24)	Adulte Form (n=27)
Erkrankungsalter			
< 2 Jahre	99 %	58 %	0 %
2-15 Jahre	1 %	42 %	0 %
> 15 Jahre	0 %	0 %	100 %
Muskelhypotonie	96 %	100 %	100 %
Kardiomegalie	95 %	4 %	0 %
Hepatomegalie	82 %	29 %	4 %
Makroglossie	62 %	8 %	4 %
Restaktivität GAA	< 1%	1-10 %	<40%
Prognose	Schnell progredient Unbehandelt Tod < 1 Jahr	Langsam progredient	Langsam progredient

Tabelle 2: Übersicht der Verlaufsformen bei Morbus Pompe (modifiziert nach Genzyme, 2007; Hirschorn et al., 2001)

Die schwerste Form ist die **infantile Form**. Die drei Leitsymptome sind eine Kardiomyopathie sowie eine Muskelschwäche und Muskelhypotonie („floppy infant“). Es kommt zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten respiratorischen Insuffizienz, teils mit Tachypnoe, Zyanose und häufig auftretenden respiratorischen Infekten. Die ersten Symptome zeigen sich in der Regel in den ersten Lebenswochen oder direkt nach der Geburt und die Kinder versterben ohne Therapie vor Erreichen des ersten bis zweiten Lebensjahres (Di Rocco et al., 2007; Hirschorn et al., 2001; Kishnani et al., 2006; Slonim et al., 2000). In einer Studie mit 10 Kindern von A.E. Slonim et al. aus dem Jahr 2000 verstarben die Kinder im Mittel bei $7,2 \pm 2,8$ Lebensmonaten (Slonim et al., 2000). Im Jahr 2003 wurden in einer Studie 20 akut erkrankte Kindern und 133 Fällen aus der Literatur verglichen. In diesem Kollektiv trat der Tod aufgrund kardialer Insuffizienz im Median zwischen dem 6-7,7 Lebensmonat ein (van den Hout et al., 2003).

Auf Grund der pathologischen Glykogenablagerungen in den verschiedenen Organen kommt es zu Organomegalien wie Hepato- und Splenomegalie sowie Makroglossie. Trinkschwäche, Bewegungsarmut sowie Wachstums- und Gedeihstörungen sind die Folge (DeRuisseau et al., 2009; Kishnani et al., 2006; Martin et al., 1973; Ploeg et al., 2008; Slonim et al., 2000; van den Hout et al., 2003).

In verschiedenen Publikationen wurde die infantile Form in eine klassische und eine nicht-klassische Form unterteilt. In einer Studie aus dem Jahr 2000 wurden 10 klassische-infantile Verläufe mit 12 nicht-klassischen verglichen.

Die nicht-klassische Form verläuft weniger foudroyant. Dies liegt vor allem an der schwächer ausgeprägten Kardiomyopathie. So sind die damit verbundenen Einschränkungen (Linksherzhypertrophie, Einschränkung des Flusstraktes und verringerte Ejektionsfraktion) weniger stark ausgeprägt.

Die Restaktivität der GAA ist bei Kindern der nicht-klassischen Form höher als bei Kindern mit der klassischen Form (Fukuda et al., 2007).

Kinder der nicht-klassischen Form zeigen erst später die ersten Symptome, im Mittel im $4,8 \pm 2,9$ Lebensmonat. Die Kinder überleben im Gegensatz zu den klassischen Verläufen deutlich länger als ein Jahr, bekommen aber fast alle eine respiratorische Insuffizienz mit Beatmungspflicht und die meisten sind auf künstliche Ernährung angewiesen (Slonim et al., 2000).

Die folgenden Tabellen (Tabelle 3 und Tabelle 4) zeigen einen Vergleich bezüglich klinischer Parameter und Überleben zwischen infantilen Patienten der klassischen Form und der nicht-klassischen Form.

Patient No.	Sex	Onset (mo)	Cardio-megaly	LVH	BivH	Cardiac function	OF obst	PR	Q	Alive
1	M	3	++	++	-	Ab	++	+	+	No
2	F	4	++	++	+	Ab	++	+	+	No
3	M	3	++	++	+	Ab	++	+	+	No
4	M	1	++	++	+	Ab	+	+	+	No
5	M	3	+	++	-	Ab	+	+	+	No
6	M	3	++	++	++	Ab	+	+	+	No
7	F	2	+	++	++	Ab	+	+	+	No
8	F	2	+	++	++	Ab	+	+	+	No
9*	M	1	++	+	-	Ab	-	+	+	No
10	M	3	++	++	++	Ab	+/-	+	+	No
Total	F/M		7 ++, 3 +	9 ++, 1 +	4 ++, 3 +, 3 -	10 Ab	3 ++, 5 +	10 +	10 +	0
							1 -, 1 +/-			
Mean ± SD		2.5 ± 1.0								

LVH, Left ventricular hypertrophy; *BivH*, biventricular hypertrophy; *OF obst*, outflow tract obstruction; *PR*, short PR interval; *Q*, Large QRS complex; *CK*, creatine kinase activity (normal 20-200 U/L); *T*, tracheostomy; *G*, gastrostomy or nasogastric feeding; *Ab*, abnormal; ++, severe; +, moderate; +/-, mild; -, absent. *Dilated cardiomyopathy.

Tabelle 3: Klinische Befunde bei infantilen Patienten mit einer klassischen Verlaufsform (Slonim et al., 2000)

Patient No.	Sex	Onset (mo)	Cardio-megaly	LVH	BivH	Cardiac function	OF obst	PR	Q	Alive (y)
11	F	3	N	+	-	N	-	+	+	13
12	M	3	N	+	-	N	-	+	+	6
13	M	6	N	+	-	N	-	+	+	No
14	M	1	N	+	+	N	-	+	+	No
15	M	11	N	+	-	N	-	+	+	4.5
16	F	7	N	-	-	N	-	N	N	3.5
17	M	2	N	+	-	N	-	+	+	2.5
18	M	3	N	+	-	N	-	+	+	No
19	F	8	+	+	+	N	-	+	+	6.5
20	F	6	N	+	-	N	-	+	+	3
21	M	3	N	+	-	N	-	+	+	1.5
22	F	4	N	+	-	N	-	+	+	1.5
Total	F/M	5/7	11 N, 1 +	11 +, 1 +	2 +, 10 -	12 N	12 -	11 +, 1 N	11 +, 1 N	n = 9
Mean ± SD		4.8 ± 2.9								4.7 ± 3.6

LVH, Left ventricular hypertrophy; *BivH*, biventricular hypertrophy; *OF obst*, outflow tract obstruction; *PR*, short PR interval; *Q*, Large QRS complex; *CK*, creatine kinase activity (normal 20-200 U/L); *T*, tracheostomy; *G*, gastrostomy or nasogastric feeding; *N*, normal; ++, severe; +, moderate; +/-, mild; -, absent.

Tabelle 4: Klinische Befunde bei infantilen Patienten mit einer nicht-klassischen Verlaufsform (Slonim et al., 2000)

Im Gegensatz zur schneller fortschreitenden und schwerer verlaufenden infantilen Form, verlaufen die **juvenile und die adulte Form** in der Regel langsamer und manifestieren sich vor allem in einer allmählichen Schwächung der Skelettmuskeln. Diese betrifft vor allem die proximalen Extremitäten und den Rumpf, sowie die Atemmuskulatur und betrifft nur in wenigen Fällen den Herzmuskel. Durch eine Schwächung der Atemmuskulatur kommt es zur respiratorischen Insuffizienz, welche die Betroffenen häufig beatmungspflichtig macht und bei weiterem Voranschreiten der Erkrankung durch Ateminsuffizienz zum Tod führt. Die langsame Schwächung der Skelettmuskeln führt im späteren Lebensalter häufig zu proximal betonten Paresen mit Einschränkung der Mobilität und einer Rollstuhlabhängigkeit (Hirschorn et al., 2001; Müller-Felber et al., 2007; Ploeg et al., 2008; Schoser et al., 2007).

Laut Definition spricht man von einer juvenilen Form in den ersten 10 Lebensjahren und von der adulten Form zwischen dem 20. und 60. Lebensjahr (Hirschorn et al., 2001). Da die juvenile und die adulte Form sowohl klinisch als auch durch das Erkrankungsalter sehr schwer voneinander abzugrenzen sind, wurde diskutiert, Morbus Pompe nur noch in eine infantile und eine late-onset Form zu unterteilen (Di Rocco et al., 2007; Müller-Felber et al., 2007; Schoser et al., 2007). In den Publikationen wird die late-onset Form definiert ab einem Erkrankungsbeginn von größer einem Jahr (Kishnani et al., 2012).

1.2.4 Vererbung und Inzidenz

Der Vererbungsmodus der Glykogenose Typ II ist autosomal-rezessiv und betrifft beide Geschlechter gleichermaßen. Das Gen für die saure α -Glukosidase liegt auf Chromosom 17q23, ist über 20 Kilobasen groß und besteht aus 20 Exons (Al-Lozi et al., 2009; Hirschorn et al., 2001; "Pompe Center Erasmus MC," 2014; Schoser et al., 2007).

Mittlerweile sind über 250 verschiedene Mutationen bekannt. Es gibt sowohl Missense-Mutationen (sinnverändernde Mutation; Ersatz einer Aminosäure durch eine andere), Nonsense-Mutationen (codiert Stopp der Translation durch Entstehen eines Stopp-Codons), splice-site-Mutationen (Mutation die zu Veränderung im Splice-Vorgang führen), partielle Deletionen (Verlust eines Teils der Nukleotid-Sequenz) als auch Insertionen (Einbau weiterer Nukleotide in die Sequenz).

Die unterschiedlichen Mutationen werden regelmäßig auf der Internetseite des Pompe Centers Rotterdam aktualisiert ("Pompe Center Erasmus MC," 2014).

Häufige Mutationen der Krankheit in der kaukasischen Population sind zum Beispiel die DelT525, Del exon18 und die splice-site-Mutation IVS 1(-13T->G). Besonders häufig in der asiatischen Population ist die Missense-Mutation 1935 (Asp645Glu), bei dieser Mutation wird die Base Cytosin durch Arginin ersetzt. In der afro-amerikanischen Bevölkerung ist die Nonsense-Mutation 2560 (Arg854X) häufig, hier wird die Base Cytosin durch Thymin ersetzt. Es besteht jedoch ein großes Spektrum an klinischen Symptomen und Verläufen bei derselben Mutation (Al-Lozi et al., 2009; Hirschorn et al., 2001; Kroos et al., 2007; "Pompe Center Erasmus MC," 2014).

Über die Inzidenz der Erkrankung sind unterschiedliche Zahlen bekannt. Diese ist abhängig von der Form der Erkrankung und der Nationalität des Patienten und liegt zwischen 1:300.000 bis 1:40.000. Die durchschnittliche Inzidenz aller Formen von Morbus Pompe liegt bei 1:40.000, die der reinen late-onset Form bei 1:60.000.

Die infantile Form wird in der mitteleuropäischen Bevölkerung auf 1:138.000 geschätzt. Eine kulturelle Abhängigkeit wird vermutet, zum Beispiel liegt die Inzidenz der chinesischen Population bei 1:40.000, dagegen in der afroamerikanischen Bevölkerung bei 1:14.000 (Di Rocco et al., 2007; Hirschorn et al., 2001).

1.2.5 Diagnostik

1.2.5.1 *Klinische Symptome*

Die Hauptsymptome der **infantilen** Verlaufsform sind Kardiomyopathie, Muskelschwäche und Muskelhypotonie. Außerdem kommt es zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten respiratorischen Insuffizienz, teils mit Tachypnoe, Zyanose und häufig auftretenden respiratorischen Infekten. Die Kinder versterben ohne Therapie noch im 1. Lebensjahr an kardialer Insuffizienz.

Die **late-onset** Formen verlaufen weniger schwer und manifestieren sich vor allem in einer allmählichen Schwächung der Skelettmuskeln, vor allem der proximalen Extremitäten und des Rumpfes, welches häufig zur Rollstuhlabhängigkeit führt. Durch eine Schwächung der Atemmuskulatur kommt es zur respiratorischen Insuffizienz, welche die Betroffenen häufig beatmungspflichtig macht und bei weiterem Voranschreiten der Erkrankung durch Ateminsuffizienz zum Tod führt (Hirschorn et al., 2001; Müller-Felber et al., 2007; Ploeg et al., 2008; Schooser et al., 2007).

1.2.5.2 Muskelbiopsie

In der Muskelbiopsie von Patienten mit Morbus Pompe zeigt sich das charakteristische Bild einer vakuolären Myopathie mit pathologischen PAS (Periodic Acid Schiff) positiven Einschlüssen, welche Glykogen entsprechen. Eine erhöhte saure Phosphatase Reaktion und immunhistochemisch eine erhöhte Lamp2 Expression zeigen eine erhöhte lysosomale Aktivität an. Lamp2 ist ein lysosomales assoziiertes Membranprotein, das zu der Familie der Membranglykoproteine gehört, und in vakuolisierten Fasern bei Morbus Pompe erhöht ist (Schoser et al., 2007). In der ultrastrukturellen Untersuchung kommen glykogenhaltige Vakuolen zur Darstellung (Dubowitz, 2007; Thurberg et al., 2006; Winkel et al., 2003). In Abbildung 3 werden Kryostatschnitte mit HE-Färbung, PAS-Färbung, saurer Phosphatase und Lamp2-Reaktion anhand einer Muskelbiopsie eines infantilen Patienten mit M. Pompe dargestellt.

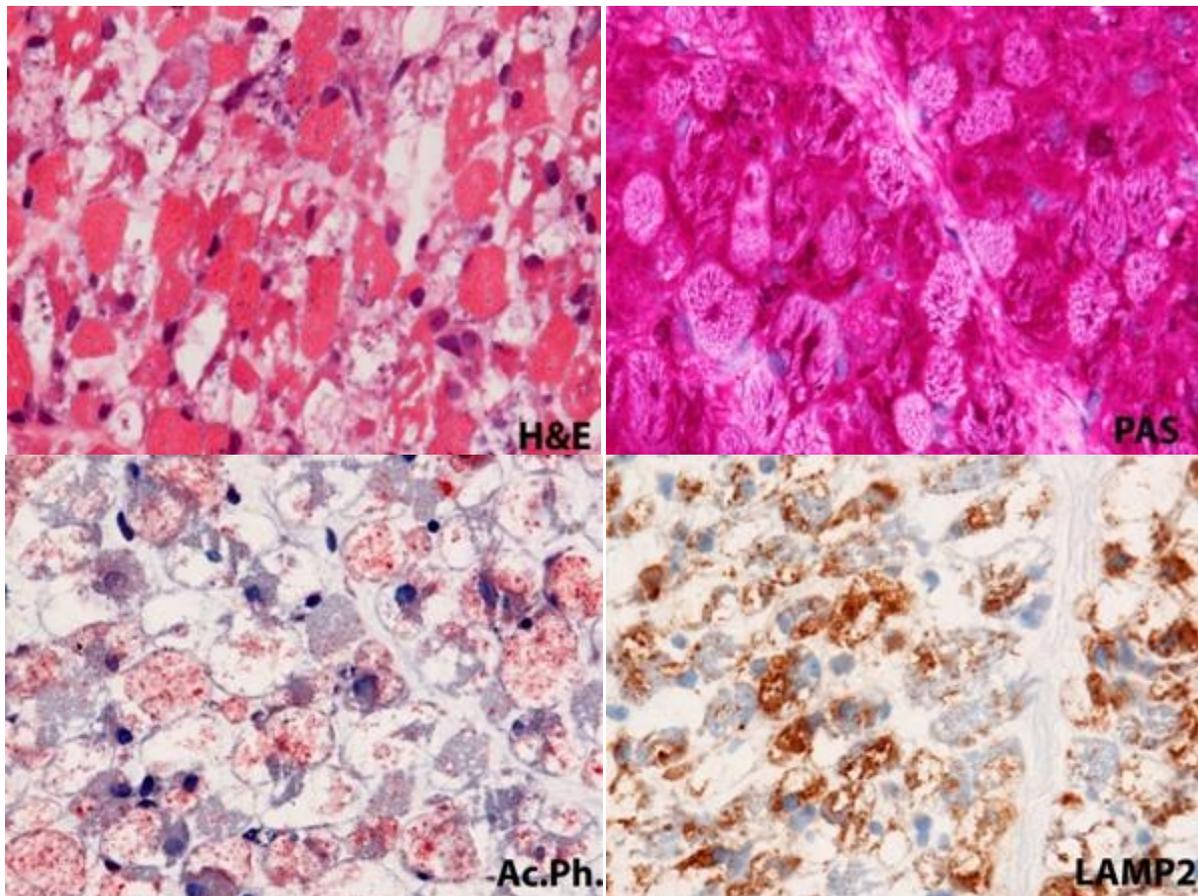


Abbildung 3: Kryostatschnitte von einer Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe: HE, PAS, saure Phosphatase-Reaktion (Ac.Ph.) und Lamp2-Immunhistochemie

In den HE-gefärbten Kryostatschnitten zeigt sich eine ausgeprägte vakuoläre Myopathie mit in der PAS-Färbung pathologischen Glykogenablagerungen. Eine verstärkte saure Phosphatase-Reaktion (Ac.Ph.) sowie eine deutliche immunhistochemische Expression für LAMP-2 zeigt die verstärkte lysosomale Aktivität an (Vergrößerung x400).

1.2.5.3 Enzymaktivitätsmessung im Gewebe

Die Enzymaktivität kann sowohl in Muskelgewebe als auch in kultivierten Fibroblasten bestimmt werden. Die Untersuchung gibt die Aktivität des betroffenen lysosomalen Enzyms, der GAA, in den Hautfibroblasten oder im Muskelgewebe an. Die Aktivität liegt bei der infantilen Erkrankungsform unter 1%. Bei den juvenilen Formen liegt die Restenzymaktivität bei 1-10% und bei den adulten Fällen bei etwa 40%. Sie wird entweder in Prozent oder in absoluten Werten in mU/mg angegeben. Bei den late-onset Formen liegt die Restenzymaktivität also deutlich höher und korreliert mit dem milderen Krankheitsverlauf (Goldstein et al., 2009; Hirschorn et al., 2001; Ploeg et al., 2008). Die Kultivierung von Fibroblastenkulturen ist zeitaufwendig und dauert 4-6 Wochen.

1.2.5.4 Enzymaktivitätsmessung im Blut

Seit einigen Jahren wird die Enzymaktivitätsmessung in Leukozyten oder gereinigten Lymphozyten, die aus dem Blut separiert werden, durchgeführt. Allerdings besteht hier die Gefahr einer möglichen Verfälschung durch Kontamination mit Granulozyten. Das Blut kann entweder auf Filterpapier aufgetragen werden „driedbloodspot“ (DBS) oder als EDTA-Blutprobe entnommen werden. Ein Vorteil der ersten Methode ist, dass nur sehr wenig Blut notwendig ist und so z.B. aus der Ferse oder dem Finger (Kapillarblut) gewonnen werden kann (Genzyme, 2007; Goldstein et al., 2009).

In einer Studie von Goldstein aus dem Jahr 2009 wurden 891 Fälle mit Verdacht auf Morbus Pompe anhand der GAA-Aktivität eines „driedbloodspot“ (DBS) untersucht. In 12,5 % der Proben zeigten sich Auffälligkeiten, welche mit der GAA-Aktivität in Muskelzellen oder Fibroblasten verglichen wurden. In dieser Studie zeigte sich, dass die Messung über getrocknetes Kapillarblut eine geringe Fehlerquote hat. Außerdem überzeugten die schon genannten Vorteile: non-invasive Materialgewinnung (Kapillarblut) und schnellere Ergebnisse, da keine Kultivierung nötig ist (Al-Lozi et al., 2009; Genzyme, 2005, 2007; Goldstein et al., 2009). Ein weiterer Vorteil der Messung der Enzymaktivität im Blut ist, dass lediglich eine Blutprobe nötig ist und kein großer invasiver Eingriff wie etwa eine Muskelbiopsie. Allerdings besteht auch hier die Gefahr der Verfälschung, da eine weitere α -Glucosidase (Maltase-Glucoamylase), diese wird in den Granulozyten gebildet, miterfasst werden kann. Mittlerweile kann diese Verfälschung durch Zugabe von Maltose oder Acarbose verhindert werden (Al-Lozi et al., 2009; Winchester et al., 2007).

Bei dem „International consensus Meeting“ im Jahr 2007 wurden die verschiedenen Diagnostikmethoden verglichen (GAA-Aktivitätsmessung in Muskelzellen, Fibroblasten, Leukozyten, Lymphozyten und getrocknetem Kapillarblut). Die Diagnostik am getrockneten Kapillarblut überzeugte vor allem durch die schnelle und günstige Durchführung, der non-invasiven Probengewinnung, sowie der Tatsache, dass man nur wenige Tropfen Blut

(Kapillarblut) benötigt. Außerdem ist die Probe einfach und kostengünstig (ohne Kühlung) in ein geeignetes Labor zu transportieren. Diese Methode kann aufgrund der einfachen Anwendung auch als Neugeborenscreening eingesetzt werden (Winchester et al., 2007). Auch in der Studie von Lukacs aus dem Jahr 2009 wurde bei 7 infantilen und 29 adulten Fällen die GAA-Aktivitätsmessung in DBS und Lymphozyten verglichen. Hier zeigten sich ebenfalls die obengenannten Vorteile wie zum Beispiel die geringere erforderliche Blutmenge (2-3 Tropfen versus 3-5 ml), die leichtere Transporthandhabung (keine Kühlung nötig) und die daraus resultierende bessere Enzymstabilität (Lukacs et al., 2009).

Ein Neugeborenen Screening wurde als Pilotprojekt in Taiwan im Zeitraum zwischen Oktober 2005 und März 2007, mit der genannten Methode der Aktivitätsmessung anhand eines DBS, bereits durchgeführt. In diesem Zeitraum wurden 45% der Neugeborenen in Taiwan untersucht (Chien et al., 2008).

Es stellt sich allerdings die ethische Frage, ob ein Neugeborenscreening weltweit etabliert werden sollte, denn in diesem Screening kann nicht zwischen infantilen und late-onset Formen unterschieden werden (Al-Lozi et al., 2009; Di Rocco et al., 2007; Kemper et al., 2007; Lukacs et al., 2009). Bisher wird das Neugeborenen Screening in Deutschland nicht durchgeführt.

1.2.5.5 Laborparameter

Bei den meisten Erkrankten liegt eine Erhöhung der Creatinkinase (CK) vor, besonders bei der infantilen Form. Dieser Wert ist ein Marker für Muskelschäden, sowohl der Skelett- als auch der Herzmuskulatur. Die CK hat eine stark altersabhängige Ausprägung und wird deswegen in der vorliegenden Arbeit in Vielfachen der altersentsprechenden Norm angegeben (Herold, 2009; Horn, 2005).

Die Normalwerte liegen maximal bei 100-200 IU/l, infantile Patienten können Werte von über 2000 IU/l aufweisen. Eine CK-Erhöhung ist aber kein sicheres diagnostisches Kriterium, da nicht alle Patienten eine Erhöhung aufweisen und auch zahlreiche andere Muskelerkrankungen mit einer CK-Erhöhung einhergehen (Schränk, 2009; Winchester et al., 2007).

Ebenso können auf Grund der Leberbeteiligung verschiedene Leberenzyme erhöht sein z.B. GPT, GOT (Schränk, 2009).

Ein diagnostischer Marker zur kardialen Funktion ist der BNP-Wert (brain natriuretic peptide). Dieses Peptid wird in den myoendokrinen Zellen der Herzkammern gebildet, dort in Form eines Prohormons namens pro-BNP gespeichert und durch den Reiz der Dehnung der Herzkammern freigesetzt. Das Hormon wirkt vasodilatatorisch und fördert die Diurese durch Hemmung des RAA-Systems (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System). Demzufolge ist dieser Wert ein guter Parameter zur Beurteilung einer Herzinsuffizienz (Herold, 2009; Horn, 2005).

Die Normwerte sind ebenfalls altersspezifisch. Deswegen wurden auch diese Werte der betroffenen Kinder in Vielfachen der altersentsprechenden Normwerte angegeben.

1.2.5.6 Elektrophysiologische und echographische Messungen

Eine Beeinflussung des Herzens und der kardialen Funktion kann am besten über die Echographie und die Elektrokardiographie (EKG) beurteilt werden. Charakteristisch sind insbesondere eine Verdickung der Ventrikelwände und des Ventrikelseptums. Diese Verdickung führt zu einer Verengung des Ventrikels und zu einer Einschränkung des Blutflusses. Es kommt auch zu Veränderungen in der Leitungsbahn, welches zu Tachyarrhythmien und zum plötzlichen Herztod führen kann (Di Rocco et al., 2007).

In der Echographie sieht man die kardiale Hypertrophie und die Flusseinschränkung in der Ausflussbahn. LVPW bedeutet „left ventricular posterior wall“ und beschreibt die Dicke der posterioren Wand der linken Herzkammer. Bei der infantilen Verlaufsform von Morbus Pompe kommt es zu einer kardialen Hypertrophie, weswegen der Wert ein guter Marker zur Einschätzung des Schweregrades des erkrankten Herzens ist. Die Wanddicke wird in Millimetern angegeben.

Die Shortening Fraction ist ein ähnlicher Wert wie die Ejection Fraktion und erlaubt eine Aussage über die Schlagkraft und Funktion des Herzens. Es wird der Unterschied des Durchmessers des linken Ventrikels während Systole und Diastole gemessen. Diese Differenz wird in Prozent angegeben, Werte zwischen 18% und 42% entsprechen Normwerten (Herold, 2009; van den Hout et al., 2003).

Unten stehende Abbildung (Abbildung 4) zeigt die Echokardiographie eines Herzens einer infantilen M. Pompe Patientin im Alter von 12 (A) und 40 (B) Wochen.

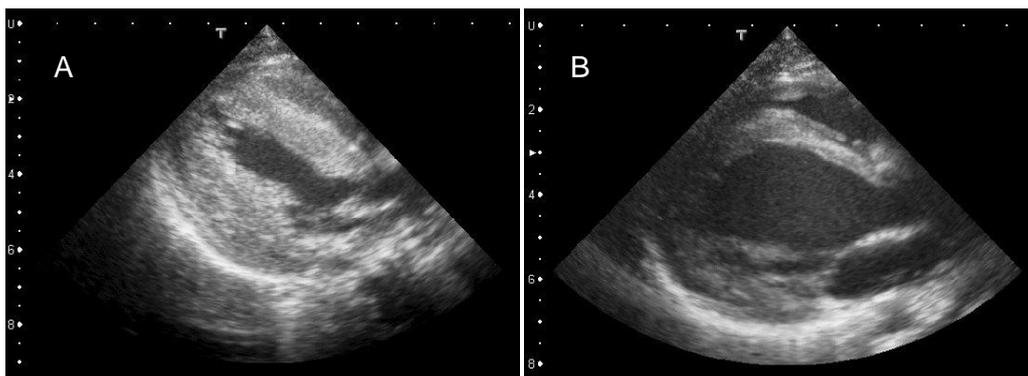


Abbildung 4: Kardiale Echographie einer Patientin mit infantilem M. Pompe nach 12 Wochen (A) und nach 40 Wochen (B)

Initial zeigt sich eine massive linksventrikuläre Hypertrophie mit Echogenitätsanhebung des Herzmuskels (A). 28 Wochen später kam es unter ERT zu einer Normalisierung der Herzmuskeldicke und zu einer Verminderung der Hypertrophie, jedoch unter Ausbildung einer irreversiblen Dilatation des linken Ventrikels (B). (Die Bilder wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. A. Hahn, Abteilung für Neuropädiatrie des Universitätsklinikums Gießen, bereitgestellt.)

Das EKG zeigt charakteristische Veränderung wie z.B. eine ST-Streckensenkung, ein verkürztes PQ-Intervall, breite QRS-Komplexe, eine invertierte T-Welle, sowie Hypertrophiezeichen wie z.B. hohe S-Zacken in V1 und hohe R-Zacken in V6. Diese Charakteristika werden durch Veränderungen in den De- und Repolarisationsphasen durch die Glykogenansammlungen in den Myozyten bewirkt (Cook et al., 2006; Schrank, 2009; van den Hout et al., 2003). Unter der ERT wird ein Rückgang der pathologischen Veränderungen des Herzens beschrieben (Klinge et al., 2005).

In einer Studie von A. Cook wurden infantile Fälle mit und ohne ERT mittels ambulanten 24h-EKG überwacht. Die schon oben genannten charakteristischen EKG-Veränderungen (kurze PR-Strecke, einem breiten QRS-Komplex sowie eine QT-Verbreiterung) steigern das Risiko für supraventrikuläre Tachykardien. Unter der ERT zeigten sich sowohl eine Erhöhung der EF und einer Verminderung des LVMI in der Elektrokardiografie und eine Rückbildung der Veränderungen im EKG. Allerdings wird durch den Umbau in den Myozyten durch die ERT (Glykogen-Clearance und Remodelling) das Risiko für Extrasystolen gesteigert, was zu supraventrikulären Tachykardien führen kann. Deswegen wird in der Studie die Empfehlung eines regelmäßigen Monitorings der betroffenen Kinder mittels ambulanten 24-Stunden-EKGs ausgesprochen (Cook et al., 2006).

In elektrischen Messungen der Skelettmuskulatur z.B. mittels Elektromyographie (EMG) kann die muskuläre Pathologie anhand pathologischer Muskelaktionspotentiale, pathologischer Spontanaktivitäten und myotoner bzw. komplex-repetitiver Serienentladungen verifiziert werden (Schooser, 2007).

1.2.5.7 Genetik

Eine sensitive Methode zum Nachweis der Erkrankung ist die DNA-Analyse. Durch die genetische Analyse können die entsprechenden Mutationen, die zur Erkrankung Morbus Pompe führen, nachgewiesen werden (Al-Lozi et al., 2009). Allerdings ist die DNA-Untersuchung nicht als Screening-Methode praktikabel, da es viel verschiedene Mutationen gibt (momentan sind über 200 bekannt) und auch de-novo Mutationen auftreten können. Außerdem ist diese Methode sehr kostenintensiv (Kemper et al., 2007).

1.2.5.8 Pränatale Diagnostik

Es besteht die Möglichkeit pränataler Diagnostik durch Entnahme von Amnionzellen oder Chorionzottenzellen und die Bestimmung der Enzymaktivität des Ungeborenen in diesen Geweben (Genzyme, 2007; Ploeg et al., 2008; San Millan et al., 2010; Schrank, 2009).

Des Weiteren ist die Gewinnung von DNA aus diesen Geweben möglich und so das Auffinden bekannter Mutationen. Durch DNA-Analysen der Eltern kann man gegeben falls das Risiko für die Geburt eines betroffenen Kindes abschätzen (San Millan et al., 2010).

1.2.5.9 Zusammenfassung der Diagnostik

In der folgende Tabelle 5 werden die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Methoden zusammen gefasst.

Methoden	Pro	Kontra
Muskelbiopsie	Morphologie ist richtungsweisend	invasiv, Nebenwirkung Anästhetika
Enzymaktivitätsmessung im Gewebe	spezifisch	invasiv, Nebenwirkung Anästhetika, dauert lange bis Kulturen angelegt sind
Enzymaktivitätsmessung im Blut	wenig invasiv, nur geringe Blutmengen nötig, leicht zu transportieren, Neugeborenscreening möglich	Gefahr der Verfälschung durch andere α -Glucosidase
Laborparameter z.B. CK	wenig invasiv	nicht spezifisch
Elektrokardiographie	nicht invasiv	nicht spezifisch
Elektromyographie	wenig invasiv	nicht spezifisch
Genetische Untersuchung	spezifisch	kostenintensiv, viele verschiedene Mutationen
Pränatale Diagnostik	spezifisch	invasiv, Abortrisiko

Tabelle 5: Übersicht der Vor- und Nachteile der verschiedenen diagnostischen Methoden bei Morbus Pompe

Bei den infantilen Verlaufsformen erfolgt die Diagnostik in den meisten Fällen über die Enzymaktivität der GAA in den Fibroblasten. In weniger als 25% wird eine Muskelbiopsie durchgeführt. Die Diagnose wird dann durch genetische Untersuchungen bestätigt. Bei den late-onset Formen wird allerdings die Verdachtsdiagnose häufig an der Muskelbiopsie gestellt und mit Hilfe von biochemischen und genetischen Methoden weiter verifiziert.

1.2.6 Therapie

Bis zum Jahre 2006 mit der Einführung der ERT konnte Morbus Pompe ausschließlich symptomatisch behandelt werden. Die erkrankten Kinder starben in der Regel innerhalb des ersten Lebensjahres an kardiorespiratorischem Versagen.

Die symptomatische Behandlung beinhaltete Physiotherapie, kardiologische Betreuung, genetische Beratung, Psychotherapie, Logopädie, Beatmung und Atemtherapie, Ernährungs- und Diätberatung und die Vermeidung von Infektionen (Hirschorn et al., 2001).

1.2.6.1 Enzymersatztherapie (ERT)

Für Patienten mit Morbus Pompe besteht seit 2006 die Möglichkeit einer Enzymersatztherapie (Enzyme replacement therapy = ERT) mit rekombinanter humaner α -1,4-Glucosidase (rh-GAA, Myozyme®). Die ERT führt bei vielen Patienten zu einer Besserung der Symptome, bei einigen Patienten kommt es jedoch kaum zu einem Therapieansprechen (Ploeg et al., 2008).

Dieser Enzymersatz wird mittels rekombinanter DNA-Technologie aus Kulturen der Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO) oder Kaninchenmilch gewonnen. Die Dosierungsempfehlung liegt bei 20mg pro Kilo Körpergewicht und wird alle 2 Wochen intravenös verabreicht (Genzym, 2009). Der Enzymersatz ersetzt das ausgefallene Enzym GAA, um das in den Zellen gespeicherte Glykogen wieder in Glukose umzuwandeln. Glukose kann dann wieder aus der Zelle ausgeschleust werden. Pathologische Glykogenansammlungen sollen dadurch reduziert und abgebaut werden.

Die Wirkung der ERT wurde in einer Studie aus dem Jahr 2008 von Ploeg et al. anhand 18 infantiler Patienten mit Morbus Pompe getestet. Die Kinder bekamen eine Dosis zwischen 10-40 mg/kg KG pro Woche. Die folgende Abbildung (Abbildung 5) zeigt die Überlebenswahrscheinlichkeiten der behandelten Kinder. Zum Zeitpunkt der Publikation bekamen die 18 Patienten bereits zwischen 52 und 106 Wochen ERT. 15 der 18 infantilen Patienten waren zum Zeitpunkt der Veröffentlichung über 18 Monate alt, 1 der 18 Patienten verstarb im Alter von 19 Monaten.

	Number of patients	Treatment duration (weeks)
Start of treatment (<6 months)	18	52-106
Survival (>18 months)	15	52
Survival (14-18 months)	3	52
Survival (14-30 months)	17	106
Death (19-8 months)	1	56
Walk	7	..
Stand	3	..
Sitting or rolling	3	..
Ventilator free	12	..

Abbildung 5: Überlebenswahrscheinlichkeit und klinisches Ansprechen infantiler Patienten unter ERT (Ploeg et al., 2008)

Eine weitere Studie wurde 2007 von Kishnani et al. durchgeführt. In dieser Studie waren 18 infantile Patienten unter ERT eingeschlossen. Hier wurde das Überleben, die Beatmungspflichtigkeit, LVPW, Wachstum (Größe und Gewicht), GAA-Aktivität und Glykogenansammlung untersucht. Alle bis auf ein Kind überlebten länger als 18 Monate und auch die Beatmungspflichtigkeit wurde reduziert (es wurde eine beatmungsfreie Überlebensrate von 66,7% erreicht). Außerdem zeigte sich, dass Kinder die mit der ERT

behandelt wurden bevor sich größere Mengen an pathologischen Glykogenablagerungen in den Muskeln sammelten, bessere motorische Leistungen zeigten, als Kinder bei denen der Krankheitsverlauf schon weiter fortgeschritten war. In der Studie wurde auch gezeigt, dass sich der Glykogengehalt der Muskel veränderte. Von 17 Patienten blieb der Glykogengehalt bei 3 Patienten stabil (+20%), bei 12 Patienten nahm der Gehalt um größer 20% ab und bei 2 Patienten um mehr als 20% zu (Kishnani et al., 2007).

In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2009 von Nicolino wurden weitere 21 infantile Fälle unter ERT untersucht. Auch hier zeigte sich eine deutliche Verbesserung im Krankheitsprogress, denn am Ende der Studie waren 71% der Kinder am Leben und 44% nicht beatmungspflichtig (siehe Tabelle 6). 62% der Kinder erreichten neue motorische Ziele. Auch in dieser Studie wurde bei einem Teil der Kinder ein Rückgang des Glykogengehalts in den Muskelzellen erreicht, bei einem anderen Teil blieb der Gehalt gleich oder stieg sogar noch an. Bei 52% kam es zu infusionsbedingten Reaktionen und 95% der Kinder entwickelten IgG Antikörper gegen Myozyme® (Nicolino et al., 2009). Das klinische Ansprechen der Patienten auf die ERT ist sehr variabel und viele beeinflussende Faktoren sind noch nicht geklärt (Angelini et al., 2012).

Age category (mo) ^a	Study patients			Untreated reference cohort	
	N	Median age at first infusion (mo)	104-week survival estimate ^b	N	Conditional 104-week survival estimate ^{b,c}
≤12	10	8.2	50.0% (19.0%, 81.0%)	59	9.2% (1.5%, 16.8%)
>12	11	17.8	90.9% (73.9%, 100.0%)	11	45.5% (16.0%, 74.9%)
All patients	21	13.0	71.1% (51.6%, 90.6%)	19	26.3% (6.5%, 46.1%)

^aAge category is age at first infusion for study patients and age at death for the reference cohort.

^bThe Kaplan-Meier method was used to compute nonparametric estimates of the survival distribution. Values are estimate and 95% CI.

^cConditional survival estimates in the reference cohort were based on median age at first infusion for the corresponding study subpopulation (e.g., 104-week conditional survival rate corresponded to survival rate at 8.2 + 24 = 32.2 mo of age for the ≤12-mo category).

Tabelle 6: Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit infantilem Morbus Pompe mit und ohne ERT (Nicolino et al., 2009)

Bezogen auf die late-onset Patienten gibt es schon einige Studien zum Therapieerfolg. In einer niederländischen Studie vom Erasmus MC University Medical Center in Rotterdam wurden 5 Patienten für drei Jahre während der Therapie begleitet. Alle fünf Patienten vertrugen die Infusionstherapie ohne relevante Zwischenfälle und waren nach 3 Jahren weiterhin ohne Beatmungstherapie. Außerdem konnten die motorischen Leistung gehalten oder sogar verbessert werden, die motorischen Leistungen wurden im 6 Minuten Walk und einem Quick motor function test (QMFT) bestimmt (van Capelle et al., 2010).

Die ERT birgt jedoch auch Nachteile, insbesondere die hohen Therapiekosten, die teilweise lebensgefährlichen Nebenwirkungen der ERT und die lebenslange Abhängigkeit der Patienten von den Infusionen (Genzyme, 2007; Schrank, 2009).

1.2.6.2 CRIM Status: Definition und Zusammenhang mit Ansprechen der ERT

CRIM bedeutet cross-reaktives immunologisches Material und wurde erstmalig in Zusammenhang mit M. Pompe im Jahr 2001 von Amalfitano beschrieben. Ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von cross-reaktivem immunologischen Material (CRIM) und der ERT wird vermutet (Amalfitano et al., 2001; Angelini et al., 2012; Kishnani et al., 2009).

Die CRIM-negativen Kinder können überhaupt keine Form des Enzym GAA herstellen, während die CRIM-positiven Kinder zumindest residuel funktionierende Enzyme bzw. nicht funktionierende Vorformen des Enzyms bilden können. Dadurch kann erklärt werden, dass CRIM negative Kinder das über die ERT zugeführten GAA als „fremd“ ansehen und Antikörper gegen das Enzym bilden. In Studien zeigt sich, dass CRIM negative Patienten zumeist einen hohen Antikörper Titer (rhGAA-IgG) haben, während CRIM positive Kinder keine und nur wenige Antikörper bilden (Amalfitano et al., 2001; Bali et al., 2012; Kishnani et al., 2012).

In der Studie von Kishnani aus dem Jahr 2009 wurden 32 infantile Patienten untersucht, davon waren 11 CRIM-negativ und 21 CRIM-positiv. Es zeigte sich in allen klinischen Parametern ein besseres Ergebnis bei den CRIM-positiven Kindern.

Nach 27 Monaten waren alle CRIM-Negativen beatmungspflichtig, jedoch nur 19% der CRIM-Positiven. Der LVMI der CRIM-Positiven ging zurück und die Motorik, gemessen über den AIMS (Alberta infant motorscale), war ebenfalls besser. Alle CRIM-negativen Patienten bildeten höhere Antikörpertiter aus und der Biomarker „Glc4“, ein Oligosaccharid im Urin, war bei diesen Patienten sehr viel höher (Kishnani et al., 2009).

In einer Studie von Rohrbach wurde der Zusammenhang zwischen der Behandlung eines CRIM-negativen Kindes mit der ERT und Omalizumab (ein monoklonaler Antikörper) untersucht. Im Rahmen der Studie zeigt sich, im Vergleich zu anderen CRIM-negativen Fällen, ein deutlich besseres kardiales und skelettmuskuläres Therapieansprechen bei diesem Kind. Um jedoch einen signifikanten Zusammenhang zwischen der zusätzlichen Behandlung mit Omalizumab und dem besseren Therapieansprechen herstellen zu können, müsste eine Studie mit größerer Fallzahl durchgeführt werden (Angelini et al., 2012; Byrne et al., 2011; Rohrbach et al., 2010).

Da es sich in der vorliegenden Doktorarbeit um eine retrospektive Studie handelt, liegt der CRIM Status für die Patienten in der eingeschlossenen Studie leider nicht vor.

1.2.6.3 Gentherapie

Neben der ERT wird an weiteren Therapiemöglichkeiten wie z.B. genetischen Therapien geforscht (Byrne et al., 2011; Douillard-Guilloux et al., 2008; Hirschorn et al., 2001; Kiang et al., 2007).

In Tierversuchen mit Mäusen wurde versucht, durch den Einbau gesunder Kopien des betroffenen Gens mittels Adenovirus-assoziierten Vektoren (rAAV), den Glykogenabbau zu ermöglichen (Byrne et al., 2011). Im Jahr 2011 wurde eine Phase I/II-Studie an betroffenen Kindern gestartet. Diese bekamen rAAV2/1-CMV-hGAA-Vektoren intramuskulär ins Diaphragma injiziert. Ergebnisse dieser Studie stehen noch aus (Byrne et al., 2011).

In einer Studie von Douillard-Guilloux aus dem Jahr 2008 wurde eine weitere Möglichkeit der Gentherapie diskutiert. Hier soll über den Einbau von shorthairpin RNA eine direkte Reduktion der Glykogenproduktion erreicht werden, eine „Substrate reduction therapy“ (SRT). Die RNA setzt an zwei Enzymen an, der Glykogensynthase (GYS) und Glykogenin (GYG). Indem die Biosynthese von Glykogen direkt verringert wird, wird die Ansammlung von Glykogen in den betroffenen Zellen reduziert. Diese Art der Therapie wird zum Beispiel bei Morbus Gaucher Typ I erfolgreich angewendet (Douillard-Guilloux et al., 2008). Bezüglich Morbus Pompe wurden bisher jedoch nur Versuche an Mäusen durchgeführt. In diesen Versuchen zeigte sich eine deutliche Reduktion der Glykogenansammlungen, unter anderem auch im ZNS, da die shRNA klein genug ist, um die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen. So erscheint die SRT zusätzlich zur ERT als vielversprechende Therapieerweiterung (Douillard-Guilloux et al., 2008).

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob man anhand der morphologischen Veränderungen in der Skelettmuskulatur von Kindern mit Morbus Pompe eine Aussage über das Ansprechen auf die Enzymersatztherapie machen kann. Es gibt viele Faktoren, welche das Ansprechen der ERT beeinflussen, doch warum einzelne Kinder ein schlechtes, andere dagegen ein gutes Ansprechen zeigen, ist bisher nicht sicher geklärt (Fukuda et al., 2007; Thurberg et al., 2006; Winkel et al., 2003). Die genaue morphometrische Analyse der Muskelbiopsien soll hier möglicherweise ein weiterer Baustein zur Therapieentscheidung sein.

An den Muskelbiopsien musste zunächst eine genaue Klassifizierung der morphologischen Veränderungen etabliert werden. Dabei war das Ziel, die morphologischen Veränderungen zu quantifizieren und in Form eines Wertes darzustellen, damit man die Veränderungen gut mit anderen klinischen Parametern vergleichen kann. Dazu sollte ein morphologisches Staging anhand der Quantifizierung der pathologischen Veränderungen der Muskelfasern etabliert werden, angelehnt an die Klassifikation von Lynch (Lynch et al., 2005). Als weitere Einflussgröße wurden an den Muskelproben die pathologischen Glykogenablagerungen quantifiziert und mit dem morphologischen Staging verglichen. Diese Klassifizierung der Skelettmuskelmorphologie sollte an möglichst kleinen, in Kunststoff eingebetteten Gewebeproben etabliert werden, da diese deutliche Vorteile (z.B. lange Haltbarkeit, einfacher Transport per Post, geringe benötigte Gewebemenge) gegenüber den konventionell eingefrorenen Proben haben.

Anschließend sollten die Ergebnisse des morphologischen Stagings mit dem klinischen Ansprechen auf die Enzymersatztherapie und den Laborparametern der Kinder vor und unter ERT verglichen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialgewinnung

Die Muskelbiopsien stammen von betroffenen Kindern mit Morbus Pompe der infantilen (n=10; 7 Mädchen und 3 Jungen) und der juvenilen Form (n=3; 2 Mädchen und 1 Junge). Des Weiteren wurden Muskelbiopsien von gesunden Kindern (n=4; 2 Mädchen und 2 Jungen) und Biopsien von adulten Fällen (n=2; 1 Frau und 1 Mann) untersucht. Die Muskelbiopsien wurden größtenteils aus dem M. vastus lateralis entnommen, in einigen Fälle aus dem M. tibialis anterior, dem M. quadriceps femoris und dem M. biceps femoris (siehe Tabelle 7). Bei 5 Patienten wurde während der Enzyersatztherapie (ERT) eine Rebiopsie entnommen. Patienten 12 und 13 sind Geschwister. Bei allen Patienten liegt eine Zustimmungserklärung zur Verwendung des überschüssigen Materials zu Forschungszwecken vor (siehe Anlage). Das Gewebe der meisten Patienten wurde in Gießen entnommen. Von den anderen Patienten (Patienten 3, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 14 und 15) wurde uns das Gewebe freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Tabelle 7 zeigt die Zusammenstellung der Patienten.

Patient	Biopsie	Herkunft	Geschlecht	Verlaufsform	Alter bei Diagnose (Monate)	Alter bei Biopsie (Monate)	Rebiopsie	Lokalisation Biopsie
Pat. 1	Biopsie 1	Gießen	w	infantil	3	2	ja	M.vastus lat.
	Biopsie 2					34		M.vastus lat.
Pat. 2	Biopsie 1	Gießen	w	infantil	2	1,5	ja	M.vastus lat.
	Biopsie 2					47		M.vastus lat.
Pat. 3	Biopsie 1	Mainz	w	infantil	2	2	ja	M.vastus lat.
	Biopsie 2					38		M.vastus lat.
Pat.4		Gießen	m	infantil	2	10	nein	M.vastus lat.
Pat.5		Münster	w	infantil	4,5	4,5	nein	M.vastus lat.
Pat.6		Münster	w	infantil	19	19	nein	M.vastus lat.
Pat.7		Gießen	m	infantil	4,5	4,5	nein	M.vastus lat.
Pat.8		Münster	m	infantil	1	26	nein	M.vastus lat.
Pat.9		Münster	w	infantil	9	9	nein	M.vastus lat.
Pat.10		Zürich	w	infantil	1,5	24	nein	M.vastus lat.
Pat.11	Biopsie 1	Gießen	w	juvenil	2	82	ja	M.vastus lat.
	Biopsie 2					136		M.tibialis ant.
Pat.12	Biopsie 1	Frankfurt	m	juvenil	49	49	ja	M.vastus lat.
	Biopsie 2					67		M.quadr.fem.
	Biopsie 3					73		M.quadr.fem.
Pat.13		Gießen	w	juvenil	4	4	nein	M.vastus lat.
Pat.14		Berlin	w	adult	420	420	nein	M.vastus lat.
Pat.15		Berlin	m	adult	540	540	nein	M.biceps fem.
Pat.16		Gießen	w	Kontrolle	/	26,5	nein	M.vastus lat.
Pat.17		Gießen	m	Kontrolle	/	14	nein	M.vastus lat.
Pat.18		Gießen	m	Kontrolle	/	15,5	nein	M.vastus lat.
Pat.19		Gießen	w	Kontrolle	/	114	nein	M.vastus lat.

Tabelle 7: Übersichtstabelle der klinischen Daten der untersuchten Patienten

3.2 Gewebeverarbeitung

Die unfixierten Muskelbiopsien der Gießener Patienten wurden im Labor des Institutes für Neuropathologie Gießen nach verschiedenen Standardverfahren weiterverarbeitet:

1. Tiefgefrorenes Gewebe wurde für die Herstellung von Kryostatschnitten verwendet.
2. Glutaraldehydfixierung wurde für Kunststoffharzeinbettungen zur Anfertigung von Semi-Dünnschnitten benutzt.
3. Formalinfixierung wurde für Paraffineinbettung zur Herstellung von Paraffinschnitten verwendet.

Von den auswärtigen Instituten Münster, Frankfurt, Mainz und Zürich wurden uns Kunstharzblöcke zur Herstellung von Semi-Dünnschnitten oder Aceton fixierte Kryostatschnitte zur Verfügung gestellt.

3.2.1 Kryostatschnitte

Für Kryostatschnitte wurde ein Teil des nativen Gewebes direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren: Das Muskelgewebe wurde auf einem Korkplättchen mit Tissue Teck® aufgestellt, wobei die Muskelfasern im Querschnitt angeschnitten werden sollten. Das Gewebe wurde, um Gefrierartefakte zu vermeiden, in Isopentan im flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Zur Anfertigung der Schnitte wurde das Gewebe der Gefrierschnitte kurz angetaut (~2 min), mit Kleber auf dem Stativ des Gefriermikrotoms „Leica CM 1950“ fixiert, dann anschließend bei einer Dicke von ~6 Mikrometer geschnitten, mit dem Glasträger abgenommen und je nach Bedarf entweder direkt gefärbt oder wieder tiefgefroren.

3.2.2 Paraffinschnitte

Ein weiterer Teil des Gewebes wurde in Formalin (4% gepuffert) fixiert und nach Standardverfahren für Paraffinschnitte weiterverarbeitet (siehe Rezept 1 und 2 im Anhang). Die Paraffinblöcke wurden mit dem Schneidegerät „Microm HM 355 S“ in ~4 Mikrometer dicke Schnitte geschnitten, mit einem Pinsel im Wasserbad entfaltet, anschließend mit dem Glasträger aufgefangen und zum Trocknen und Fixieren für etwa 30 Minuten auf den Wärmeofen gelegt.

3.2.3 Kunstharzeinbettung (Semidünnschnitte)

Für die Semidünnschnitte wurde ein kleines Gewebsteil in gepuffertem 3%igen Glutaraldehyd über Nacht, mindestens jedoch für 4 Stunden fixiert und dann in Puffer überführt. Im Gerät der Firma Leica „Leica EMTP“ wurde das Gewebe anschließend eingebettet und in Agar 100 „R1031“ fixiert. Anschließend wurde der Eponblock über 3 Tage im Wärmeofen (bei 60 Grad Celsius) ausgehärtet und getrocknet. Danach wurden die Blöcke zugetrimmt mit dem Gerät „Ultratrim“ der Firma Bausch und Lomb. Von den Kunstharzblöcken wurden mit einem Ultramikrotom „OmU3“ der Firma Reichert Austria ~1 Mikrometer dünne Schnitte (Semidünnschnitte) angefertigt und auf Objektträgern aufgebracht. Diese wurden für 1 Stunde auf einem Streckofen der Firma Medite getrocknet und anschließend gefärbt. (Siehe Anhang Rezepte: 7, 8, 9 und 10)

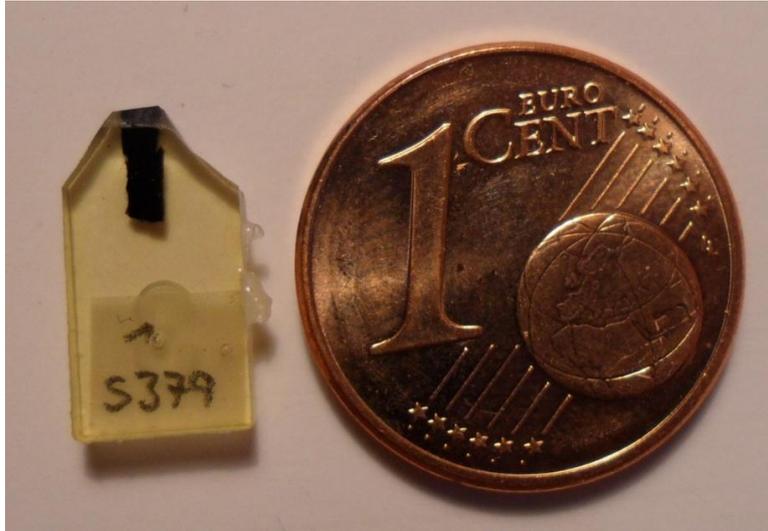


Abbildung 6: In Epon eingebettete Muskelbiopsie im Größenvergleich

3.3 Vorversuche (Färbeverfahren)

Das Ziel der Vorversuche war es, einen bestmöglichen Kontrast der PAS-Färbung an den Muskelschnitten zu erreichen, um eine optimale morphologische Auswertung (halb-digitalisiert und lichtmikroskopisch) zu etablieren. Die PAS Färbung ist keine spezifische Anfärbung von Glykogen, sondern kann auch anderes PAS positives Material darstellen (z.B. Cellulose, Glykolipide und -proteine). Eine modifizierte PAS Färbung soll eine höhere Spezifität der Glykogendarstellung erreichen.

Die Färbevorversuche wurden durchgeführt an:

- Muskelgewebe von Patienten ohne morphologische Pathologika
- menschlichem Lebergewebe (hoher Glykogengehalt)
- Muskelgewebe von Mäusen
- Muskelgewebe von Patienten mit Morbus Pompe

Die Färbungen wurden an Paraffinschnitten, Gefrierschnitten und Semidünnschnitten durchgeführt.

3.3.1 PAS-Färbung an Kryostatschnitten und Paraffinschnitten

Die ersten Vorversuche wurden sowohl mit Paraffin- als auch mit Gefrierschnitten durchgeführt.

Zuerst wurde eine PAS Färbung auf alkoholhaltiger Basis etabliert, sowie weitere Versuche mit unterschiedlichen Gegenfärbungen unternommen.

Glykogen ist wasserlöslich und wird durch eine Vorbehandlung und/oder Färbung, die auf Wasserbasis beruht, aus den Zellen geschwemmt und ist somit nicht mehr darstellbar. Aus diesem Grund wurden Versuche unternommen, die eigentlich auf Wasserbasis beruhende PAS Färbung auf eine alkoholhaltige Basis umzustellen. Dies wurde erreicht, indem die Wasseranteile der Standardfärbung durch 100%igen Alkohol ersetzt wurden. Bei der

alkoholbasierten Färbung kam es nicht zum „Auslaufen“, sondern zu einer guten Darstellung des PAS positiven Glykogens (siehe Rezept 3, 4, 5 und 6 im Anhang).

Dabei kam es zu folgenden Ergebnissen:

1. Durch Versuche mit unterschiedlicher Einwirkdauer des Schiffschens Reagenz wurde, um das beste Färbeergebnis zu erzielen, eine Dauer von 10 min für Gefrierschnitte und 15 min für Paraffinschnitte festgelegt.
2. Kryostatschnitte liefern ein besseres Ergebnis als Paraffinschnitte, ein klareres Bild, vermutlich wegen einer stärker ausgeprägten Substanzflucht des Glykogens bei Paraffinschnitten. Diese ist laut Literatur bei alkoholbasierten Färbungen nicht vermeidbar.

„Vor der Front der eindringenden Fixierlösung tritt eine Verlagerung zytoplasmatischer Einschlüsse, ganzer Zellorganellen oder des ganzen Zellkerns auf. Dieses Phänomen wird Substanzflucht genannt. Besonders bekannt ist die Substanzflucht des Glykogens Das Fixiermittel entzieht Wasser und führt so zur Konzentrationserhöhung der gelösten Stoffe im Zytoplasma, es vernetzt und fällt die Proteine aus , und engt damit den für die freie Diffusion zur Verfügung stehenden Raum ein; die im Fixiermittel nicht löslichen Substanzen sind so in ihrer Verteilung auf die wässrige Phase beschränkt. Sie weichen vor dem eindringenden Fixans zurück, bis sie von einer Zellmembran am weiteren ‚Flüchten‘ gehindert werden.“ (Mulisch et al., 2001)

3. Die Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylin, Methylenblau (Löffler) und Richardson Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlicher Einwirkdauer ausprobiert. Der beste Blau-Violett-Kontrast wurde sowohl bei Kryostat- als auch bei Paraffinschnitten mit Richardson Lösung (Verhältnis 19:1) und einer einminütigen Einwirkdauer erzielt.

Abbildung 7 soll die morphologischen Veränderungen der Muskelbiopsien der an Morbus Pompe erkrankten Patienten verdeutlichen.

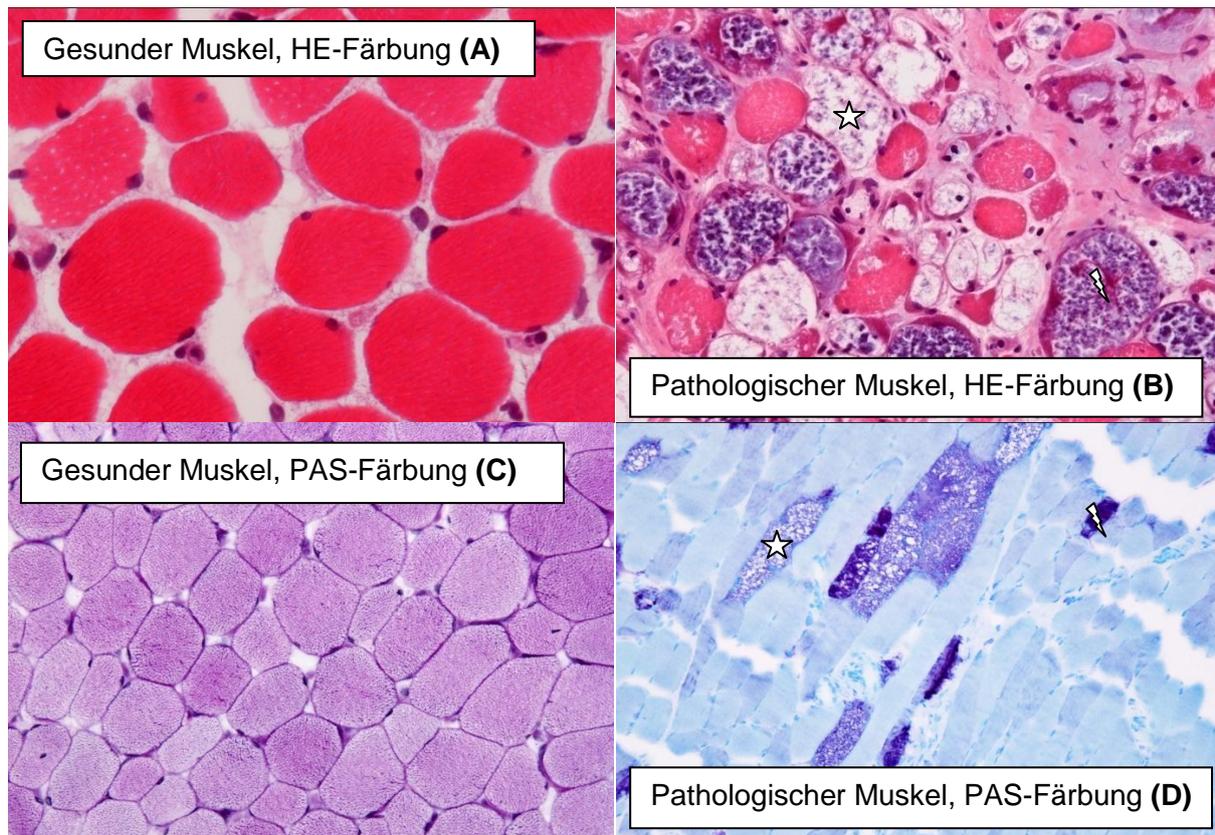


Abbildung 7: Kryostatschnitte von Muskelbiopsien von einem gesunden Kind (A,C) und einem Patienten mit Morbus Pompe (B,D)

In der HE Färbung zeigt sich bei Morbus Pompe Patienten eine verstärkte Kalibervariation der Muskelfasern als Ausdruck der Myopathie mit zahlreichen vakuolisierten Muskelfasern (☆) (B). Die pathologischen Glykogenablagerungen (⚡) kommen in der PAS Färbung zur Darstellung (D). (Vergrößerung x200 (C, D), x400 (A, B))

3.3.2 Versuche zu Unterdrückung der unspezifischen PAS-Färbung

Um eine spezifische PAS Färbung des Glykogens zu erreichen wurde eine Vorbehandlung mit den Enzymen Dimedon (5,5-Dimethyl-1,3-cyclohexandion) und Diastase durchgeführt. Dimedon blockiert alle Aldehydgruppen, die nicht von Glykogen geliefert werden.

So werden andere PAS positive Stoffe, die nicht Glykogen entsprechen, inaktiviert und sind nicht mehr PAS positiv darstellbar (Mulisch et al., 2001).

Diastase ist ein Enzym, das ähnlich der α -Amylase, PAS positive Substanzen durch Auflösung der bestehenden Glykogenverbindungen verdaut und ist daher als Negativprobe sinnvoll im Vergleich mit PAS positiven und Dimedon vorbehandelten Schnitten.

Eine wesentliche Schwierigkeit bestand darin, die Dimedon- und Diastasebehandlung auf alkoholischer Basis durchzuführen, da beide Substanzen laut Hersteller nur für wässrige Lösungen ausgelegt sind.

Die Schnitte wurden mit unterschiedlicher Konzentration Diastase pro Flüssigkeitsmenge (0,1 %/ 0,5 %/ 1%), unterschiedlicher Einwirkdauer der Diastase auf dem Muskelgewebe (1

Stunde/ 3 Stunden/ 24 Stunden), veränderter Konzentration des verwendeten Alkohols (70%/ 96%/ 100%) und der Temperatur (Raumtemperatur/ 37 Grad/ 60 Grad) gefärbt (siehe Rezept 13 und 14).

Ergebnisse:

1. Eine Dimedonvorbehandlung ist als Standard sinnvoll, da unspezifische PAS positive Substanzen, außer Glykogen, nicht angefärbt werden.
2. Auf Grund des besten Ergebnisses wurde für die Vorbehandlung folgende Konzentration und Einwirkdauer festgelegt: 5% Dimedon in 100% Alkohol (z.B. 2 Gramm Dimedon auf 40 ml 100% Alkohol). Der Schnitt wurde bei 60 Grad für 24 Stunden im Dimedon belassen.
3. Diastase ist sehr schlecht in Alkohol löslich und führt darin gelöst nicht zu einem befriedigenden Ergebnis.

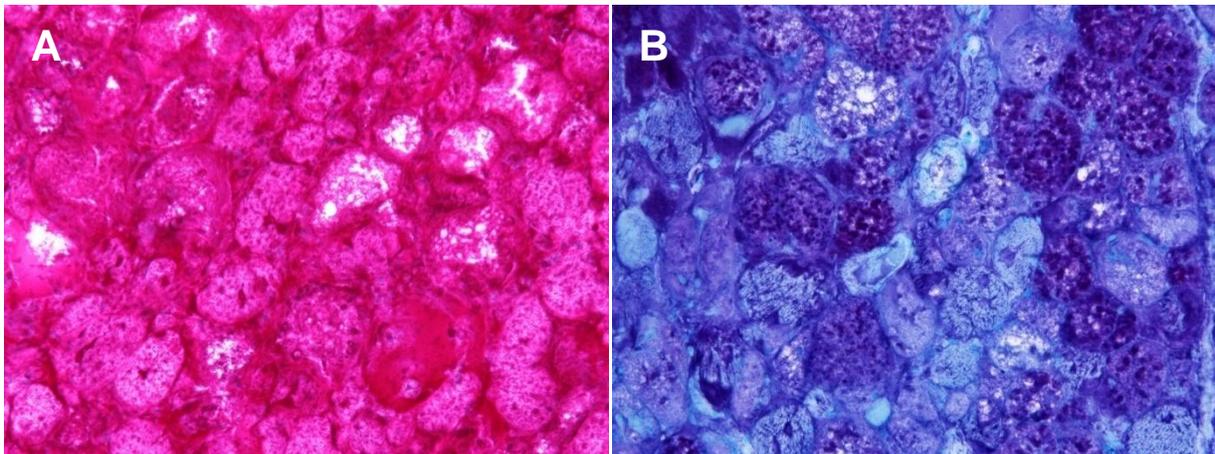


Abbildung 8: Muskelbiopsie eines Patienten mit Morbus Pompe (Kryostatschnitte)

In der PAS Färbung (A) kommen pathologische PAS positive Ablagerungen zur Darstellung. Eine unspezifische PAS Färbung wird durch die PAS-Dimedon-Färbung (B) unterdrückt (Vergrößerung x200).

3.3.3 Kontraststeigerung durch unterschiedliche Gegenfärbungen

In der Standard PAS Färbung wird Richardson Lösung zur Gegenfärbung verwendet. Zur Steigerung des Kontrastes der Zellgrenzen der Muskelfasern wurden verschiedene Färbungen getestet.

1. Lichtgrün (siehe Rezept 11 im Anhang)

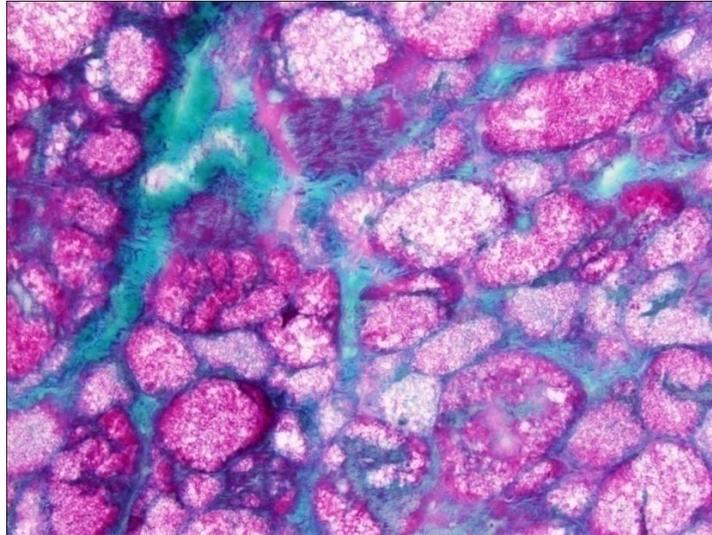


Abbildung 9: PAS gefärbte Muskelbiopsie eines Patienten mit Morbus Pompe (Kryostatschnitt) mit Kontraststeigerung durch Gegenfärbung mit Lichtgrün (Vergrößerung x200).

2. Spektrinfärbung

Ergebnis:

Die Spektrinbehandlung wirkt im alkoholischen Medium nicht, die Schnitte sind PAS positiv, es ist aber keine Spektrinfärbung sichtbar.

3. Versilberung im alkoholischen Medium (siehe Rezept 12 im Anhang)

Ergebnis:

Die Zellgrenzen sind dunkel angefärbt, die Zellen selbst erscheinen bräunlich, das Glykogen ist PAS positiv. Das Gewebe ist nicht zerrissen und das Glykogen nicht weggewaschen.

3.3.4 PAS-Färbung an Semi-Dünnschnitten

Zu Beginn der Versuche mit Semidünnschnitten wurde nach der Färbearbeitung aus dem Paper von Colleen M. Lynch gefärbt (Lynch et al., 2005) (siehe Anhang Rezept 9).

Das Ergebnis war nicht zufriedenstellend, da die violette PAS-Färbung durch den blauen Methylenfarbstoff stark überfärbt wurde. In weiteren Versuchen wurde die Dauer der Gegenfärbung zeitlich variiert, das Ergebnis blieb aber weiterhin unbefriedigend, da die PAS-positiven Bereiche nicht violett, sondern je nach Einwirkdauer hell- bis dunkelblau waren. So ließ sich kein schöner Blau-Violett-Kontrast erzielen. Nach vielen Versuchen und der telefonischen Hilfe von Frau Sutter aus dem Muskellabor der Kinderklinik Freiburg entstand dann eine Färbemethode, mit der das erwünschte Ergebnis, ein starker Blau-Violett-Kontrast zwischen den PAS-positiven und den PAS-negativen Bereichen, erzielt wurde. Dieses Rezept unterscheidet sich nur in der unterschiedlichen Reihenfolge der einzelnen Schritte und anderen Einwirkzeiten vom vorherigen Rezept (siehe Anhang Rezept 10).

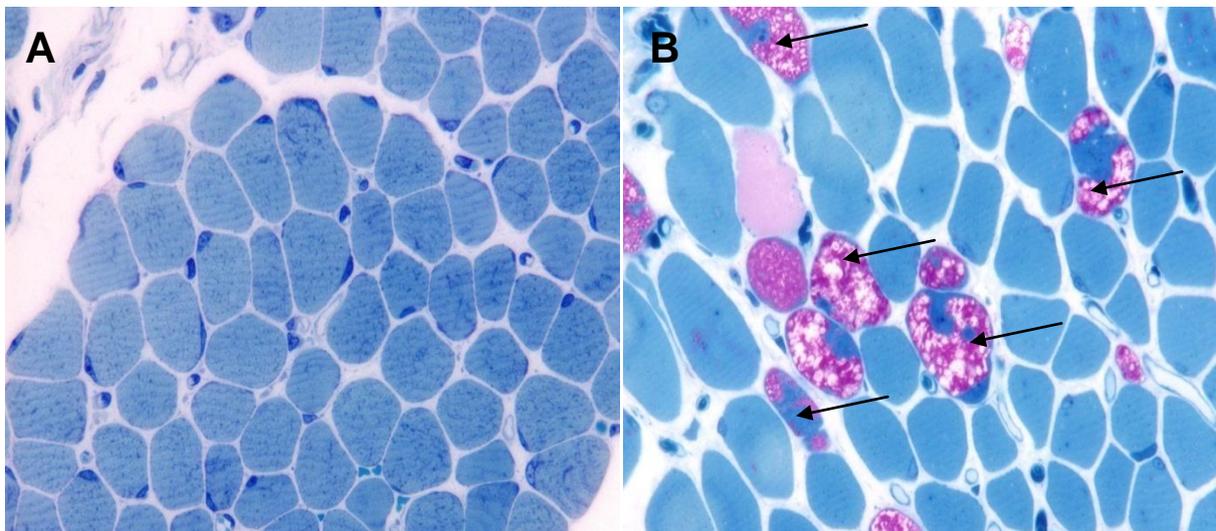


Abbildung 10: Gegenüberstellung Semidünnschnitte gesunder Muskel (A) und pathologischer Muskel (B) mit PAS-Färbung.

In der Muskelbiopsie des Patienten mit Morbus Pompe (B) sieht man deutlich abgrenzbare PAS positive Einschlüsse in den Muskelfasern (Pfeile) (Vergrößerung x400).

Anhand der Vorversuche und durch die unterschiedlichen Ergebnisse der Färbungen wurde entschieden, für die Auswertung der einzelnen klinischen Fälle Kryostatschnitte und Semidünnschnitte zu verwenden, allerdings standen bei einzelnen externen Fällen nur Kunstharzblöcke zur Verfügung.

Aufgrund der großen Gewebsfläche der Kryostatschnitte wurde bei der Auswertung pro Fall jeweils nur ein Schnitt ausgewertet. Die angeschnittene Fläche der Semidünnschnitte ist dagegen sehr viel kleiner, deswegen wurde darauf geachtet immer mindestens 2 oder mehr verschiedene Pyramiden auszuwerten, solange genug Gewebe verfügbar war.

In den folgenden Abbildungen (Abbildung 11 und Abbildung 12) sind die morphologischen Veränderungen der Muskelfasern anhand zweier Beispiele im Vergleich KS-PAS Dimedon und SD-PAS dargestellt.

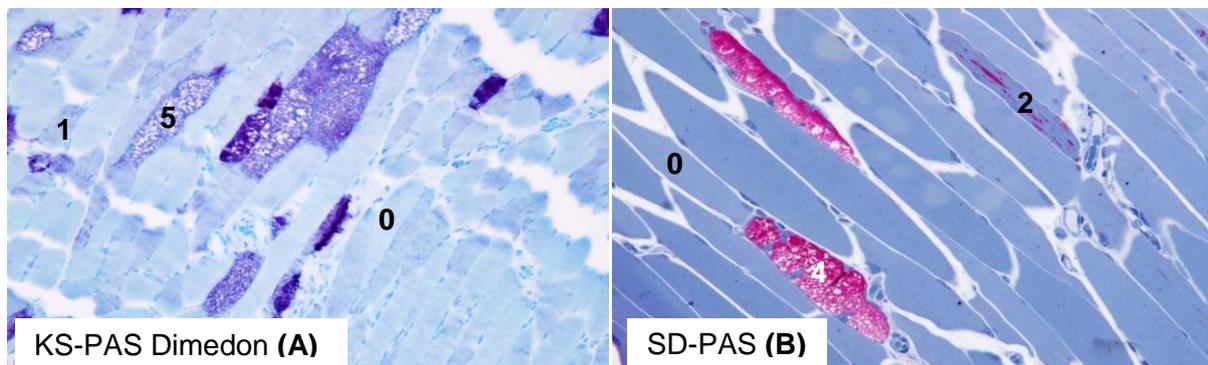


Abbildung 11: Morphologische Veränderungen von Muskelfasern eines Patienten mit infantilem M. Pompe (Pat.2 Biopsie 2), KS-PAS Dimedon (A) und SD-PAS (B), Vergrößerung x200

In der Abbildung sind Muskelfasern verschiedener Stadien gekennzeichnet: 0: Stadium 0, 1: Stadium 1, 2: Stadium 2, 3: Stadium 3, 4: Stadium 4 und 5: Stadium 5.

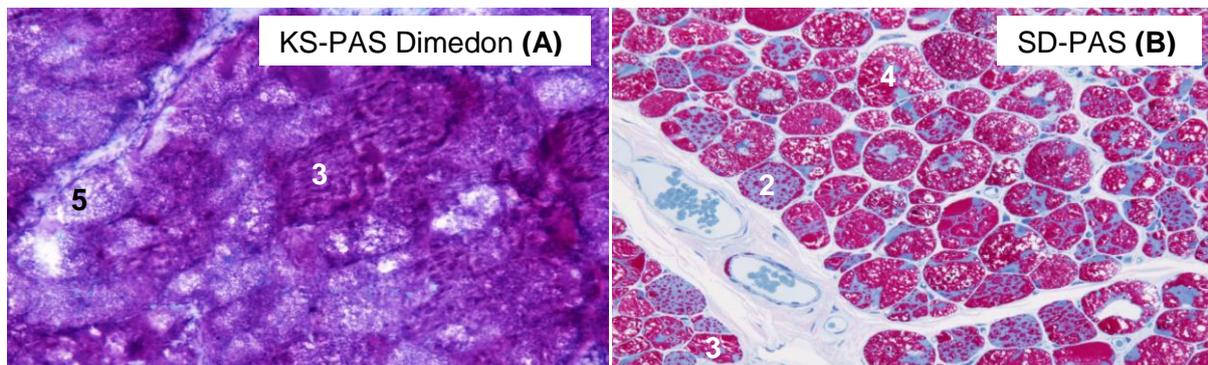


Abbildung 12: Morphologische Veränderungen von Muskelfasern eines Patienten mit infantilem M. Pompe (Pat.3 Biopsie 2), KS-PAS Dimedon (A) und SD-PAS (B), Vergrößerung x200

In der Abbildung sind Muskelfasern verschiedener Stadien gekennzeichnet: 0: Stadium 0, 1: Stadium 1, 2: Stadium 2, 3: Stadium 3, 4: Stadium 4 und 5: Stadium 5.

Zusammenfassend zeigen sich im Vergleich der durchgeführten Färbemethoden an den verschieden aufbereiteten Muskelgewebeprobe deutliche Vorteile bei der Verwendung von PAS gefärbten Semidünnschnitte (PAS-SD), welche aus Glutaraldehyd fixierten, in Kunststoff eingebetteten Gewebe durchgeführt werden. In den PAS-SD kommen auch geringe Glykogenablagerungen zur Darstellung, welche zum Teil in den Kryostatschnitten und in den Paraffinschnitten übersehen werden können. Zusätzlich können die in Kunststoff eingebetteten Gewebe sehr viel einfacher versendet werden als unfixiertes Gewebe.

3.4 Quantifizierung der pathologischen Veränderungen und der Glykogenablagerungen in den Muskelfasern

Morbus Pompe ist eine generalisierte Erkrankung mit Glykogenablagerungen in zahlreichen Organen. In klinischen Studien wurde die Glykogen Clearance in Muskelbiopsien gemessen, das heißt inwieweit die Glykogenablagerungen in der Skelettmuskulatur unter Therapie (ERT) vermindert sind (Thurberg et al., 2006). In dieser Arbeit soll eine detaillierte Quantifizierung der pathologischen Veränderungen der Muskelfasern (MA1 und MA2, siehe 3.4.1) erfolgen und mit der Analyse der Glykogenablagerungen (MA 3, siehe 3.4.2) verglichen werden.

Die Untersuchungen wurden nach Vergleich verschiedener Färbemethoden an PAS gefärbten Schnitten durchgeführt. Es wurden sowohl PAS gefärbte Kryostatschnitte als auch Semidünnschnitte analysiert.

3.4.1 Quantitative Analyse der pathologischen Veränderungen der Muskelfasern (MA1 und MA2)

Die pathologischen Veränderungen wurden modifiziert nach der Studie von Thurberg et al in verschiedene Stadien eingeteilt (Tabelle 8) (Thurberg et al., 2006).

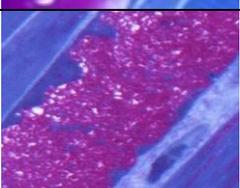
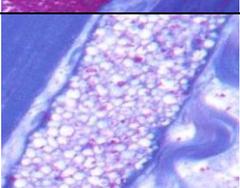
Stadium 0		normale Muskelfaser
Pathologisches Stadium 1		feintropfig mit einzeltem PAS positiven Material durchsetzt (< 10%), myofibrilläre Architektur erhalten
Pathologisches Stadium 2		grob tropfig 10-80% PAS positiv, myofibrilläre Architektur erhalten
Pathologisches Stadium 3		> 80% PAS pos., keine Vakuolen, myofibrilläre Architektur gestört
Pathologisches Stadium 4		gemischte Vakuolen (PAS positiv und PAS negativ), myofibrilläre Architektur gestört
Pathologisches Stadium 5		leere Vakuolen (PAS und Methylenblau negativ), myofibrilläre Architektur gestört

Tabelle 8: Stadieneinteilung der pathologischen Veränderungen am Skelettmuskel für die Analyse MA1 und MA2 (PAS gefärbte Semidünnschnitte; Vergrößerung x400)

Für die Auswertungen MA1 und MA2 wurden die Muskelfasern abhängig von den pathologischen Veränderungen in verschiedene Stadien (siehe Staging Tabelle 8) eingeteilt. Bei MA1 wurde jede einzelne Muskelfaser einem Stadium (0-5) zugeordnet und die Ergebnisse prozentual auf die Gesamtmenge der Muskelfasern berechnet (% Muskelfasern mit Stadium X/Gesamtmenge Muskelfasern).

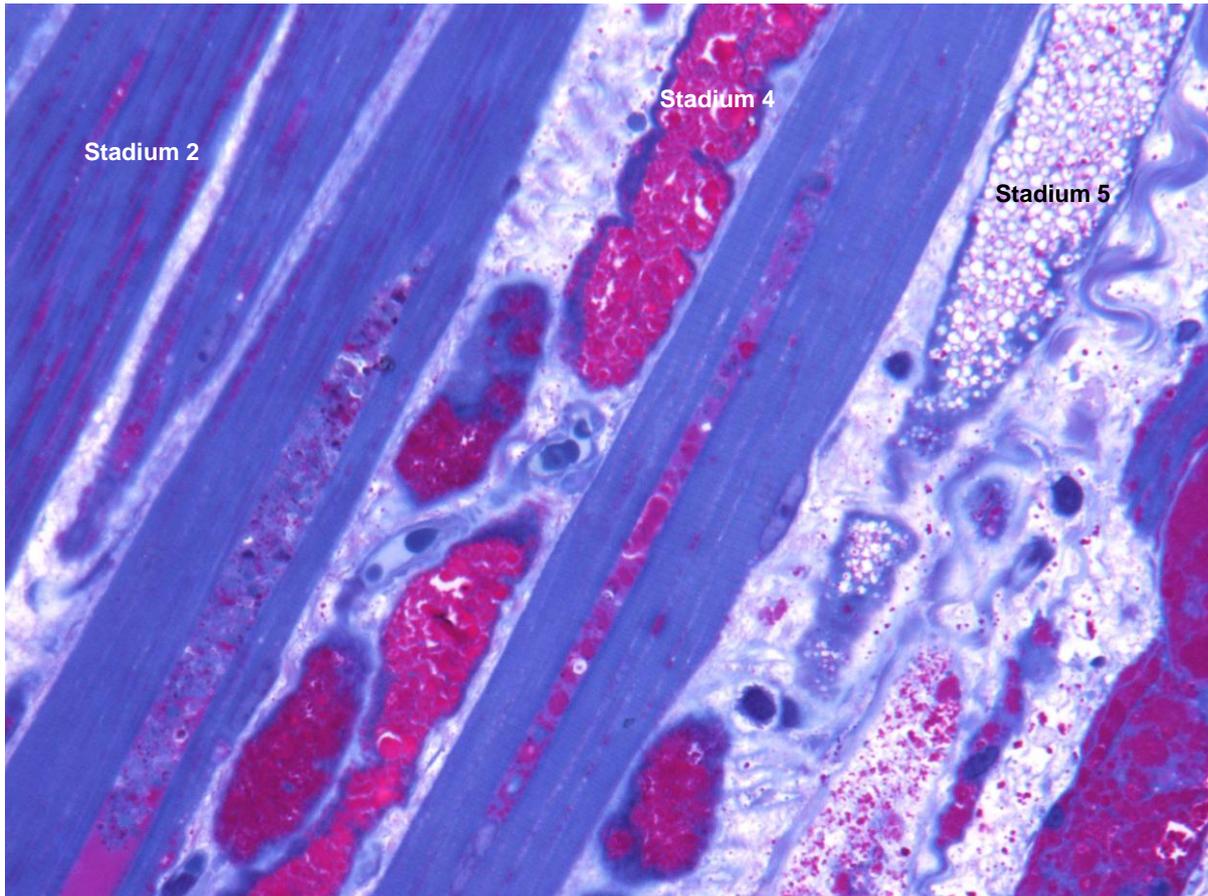


Abbildung 13: PAS gefärbter Semidünnschnitt: Bei der Auswertung MA1 werden die einzelnen Muskelfasern einem Stadium zugeordnet (Vergrößerung x400)

Beispiel für Auswertungsblatt 1:

Auswertung anhand der Muskelfasern		Staging				
Pat.1 Biopsie 1 Pyramide 16		Erscheinungsbild: Nerven und Gefäße mit angeschnitten				
Faserschnitt: längs und quer gemischt		Vergrößerung 40fach				
gefärbt am 21.08.2009		ausgewertet am 02.09.2009				
Bildnummer	normale Muskelfasern	Stadium 1	Stadium 2	Stadium 3	Stadium 4	Stadium 5
1	0	13	91	11	14	0
2		6	34	4	7	
3		3	14	2	30	
4		7	57	14	10	
5		17	91	11	6	
6		7	4	8	11	
7		12	51	9	13	
8		6	45	8	4	
9		14	20	2	14	
10		5	44	2	4	
11		14	7	8	13	
12		2	17	13	8	
13		15	71	25	4	
14		15	8	1	14	
15		6	4	5	25	
16		11	32	14	10	
17		9	67	8	2	
18		3	36	7	15	
19		13	10	3	4	
20		5	49	5	10	
21		4	10	2	24	
22		4	62	9	6	
23		0	62	9	19	
24		0	62	15	17	
25		0	79	20	10	
Total	0	191	1027	215	294	0
Gesamtzahl der gewerteten Muskelfasern	1727	1727	1727	1727	1727	1727
Verhältnis	0	0,11059641	0,59467284	0,12449334	0,17023741	0
Prozent	0%	11%	59%	12%	17%	0%

Tabelle 9: Beispiel der Stadieneinteilung der Muskelpathologie mit Auswertungsmethode MA1 (Patient 1 Biopsie 1)

Die hier nach den Stadien eingeteilten Muskelfasern werden auf die Gesamtzahl aller Muskelfasern bezogen, z.B. entsprechen in diesem Präparat 11% aller ausgewerteten Muskelfasern dem Stadium 1.

Für die Auswertung MA2 wurde ein Mikroskop (Olympus BX 51) mit motorisiertem Tisch und der Software „New CAST“ (Computer Assisted Stereology Tool) von Visiopharm genutzt. Ein an das Mikroskop angeschlossener PC erzeugt mit Hilfe der genannten Software ein digitales Bild der eingelegten Schnitte. Dieses Bild wird erstellt, indem zufällig, in einem vorher festgelegten Bereich, ein prozentualer Anteil der Gesamtfläche verwendet und in mehrere, genau gleichgroße Bildern ausgegeben wird. Anschließend wird ein Punkteraster über das Bild gelegt (3x3er Gruppen und jeweils 3x3 Punkte pro Gruppe, das entspricht einer Kreuzanzahl pro Bild von 81 Stück). Die einzelnen Bilder entsprechen einer Fläche von $94814,44 \mu\text{m}^2$ (Breite: $354,86 \mu\text{m}$, Länge: $267,19 \mu\text{m}$).

Die Schnitte wurden auf dem motorisierten Objektisch in das Mikroskop (Olympus BX 51) bei 1,25fachem Objektiv eingelegt, die Software gestartet und die gewünschten Stellen durch die Ausschneidefunktion markiert. Die Analyse wurde dann mit dem 40er Objektiv durchgeführt.

Das automatische Sampling des oben genannten Programmes wurde eingestellt (bei Semidünnschnitten werden 100% der Fläche verwendet, bei Kryostatschnitten 10-15 %). So ergeben sich 15-60 Bilder, je nachdem, wie viele davon auswertbar sind.

Nicht auswertbare Bilder liegen vor, wenn ungefärbte Randbereiche, unscharfe Bereiche, Bereiche mit wenigen Muskelfasern bzw. Bindegewebe zu sehen sind.

Der zu untersuchende Schnitt wurde zunächst umfahren, um die nicht auszuwertenden Bereiche auszunehmen. Das gewünschte Areal wurde dann mit einem Punkteraster (Grid) mit jeweils 81 Punkten pro Bild versehen und analysiert. Jeder Punkt wurde einem Stadium (siehe Staging) zugeordnet, so kann eine Muskelfaser, auf die mehrere Punkte fallen, mehreren Stadien entsprechen. Somit entspricht das Ergebnis dem prozentualen Anteil der Fläche verschiedener Stadien bezogen auf die Gesamtfläche des Schnittes.

Es wurden pro Fall immer mindestens 2 Pyramiden ausgewertet, ausser bei einem Fall, bei diesem war nur eine Pyramide verfügbar. Die Muskelfasern der einzelnen Fälle waren entweder im Quer- oder im Längsschnitt angeschnitten.

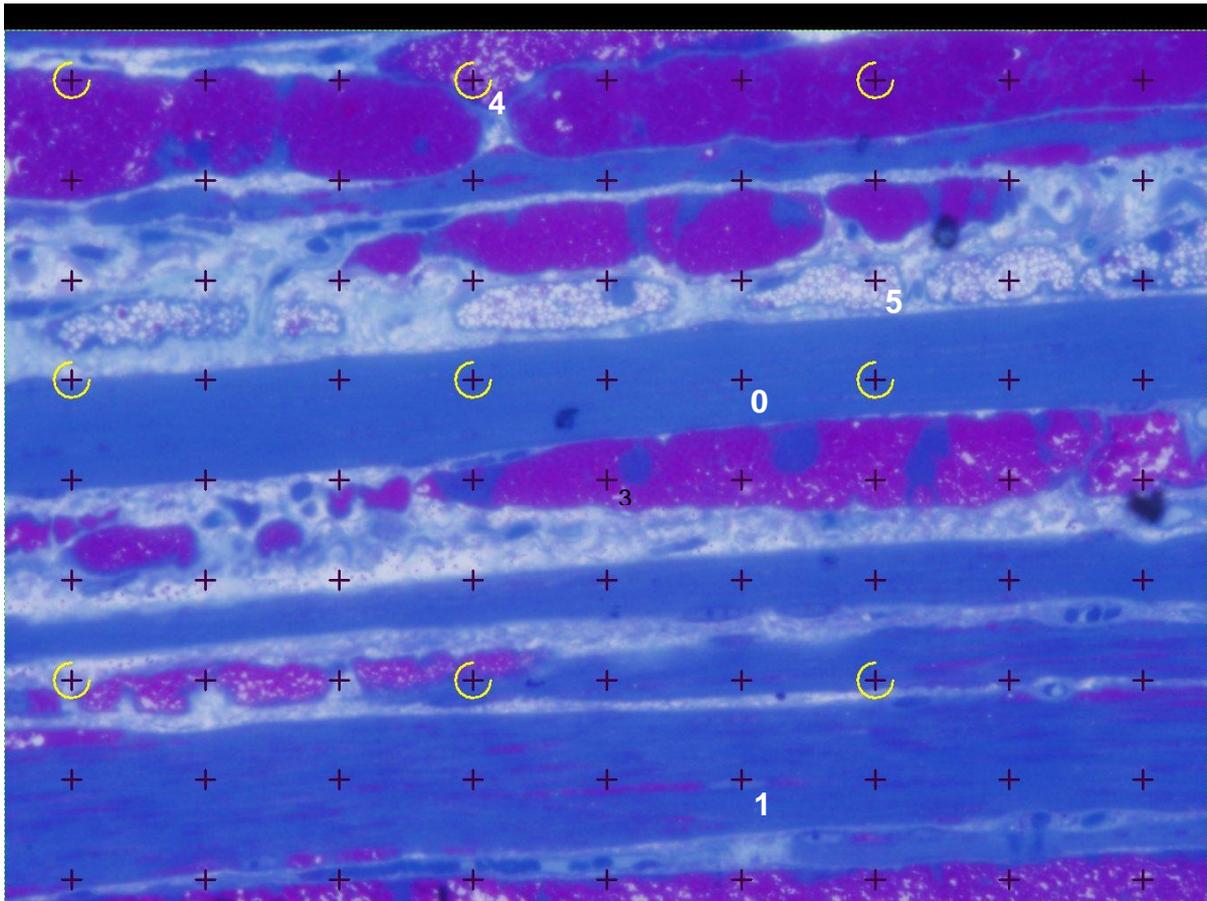


Abbildung 14: PAS gefärbter Semidünnschnitt: Auswertung MA2 mit Punkteraster (Vergrößerung x200)

In der Abbildung wurden beispielhaft Kreuze markiert, die entsprechenden Stadien zugeordnet wurden. Zum Beispiel entspricht +5 einem Kreuz, welches auf einer Muskelfaser liegt, die Stadium 5 zugeordnet wurde.

Hier wird also der prozentuale Anteil der Kreuze, die auf Muskelfasern einer bestimmten Kategorie fallen, im Verhältnis zur Gesamtzahl aller mitgewerteten Kreuze gesetzt.

Es wurden nur die Kreuze berücksichtigt, die klar auf Muskelfasern lagen, nicht auf zwei unterschiedliche Muskelfasern fielen, nicht auf Bindegewebe, Nerven oder Gefäßen lagen. Dasselbe galt für nicht klar definierbare Bereiche oder weiße Randbereiche.

Beispiel für Auswertungsblatt 2:

Auswertung anhand des Punkterasters		Staging				
Pat.1 Biopsie 1 Pyramide 16		Erscheinungsbild: Nerven und Gefäße mit angeschnitten				
Faserschnitt: längs und quer gemischt		Vergrößerung 40 fach				
gefärbt am 21.08.2009		ausgewertet am 09.09.2009				
Bildnummer	normale MF	Stadium 1	Stadium 2	Stadium 3	Stadium 4	Stadium 5
1	0	5	4	1	0	2
2		2	3	0	0	2
3		4	11	3	6	0
4		8	19	8	0	5
5		9	9	8	0	2
6		7	6	3	1	0
7		17	18	12	5	0
8		10	14	15	2	0
9		5	11	9	7	0
10		7	8	10	3	0
11		27	14	1	4	0
12		5	4	1	3	0
13		10	18	2	11	0
14		14	17	4	7	0
15		21	14	8	7	0
16		17	5	7	4	0
17		18	11	4	9	0
18		10	10	5	9	0
Total	0	196	196	101	78	11
Gesamtzahl der gewerteten Kreuze	582	582	582	582	582	582
Verhältnis	0	0,33676976	0,33676976	0,17353952	0,13402062	0,01890034
Prozent	0%	34%	34%	17%	13%	2%

Tabelle 10: Beispiel der Stadieneinteilung der Muskelpathologie mit Auswertungsmethode MA2 (Pat.1 Biopsie 1)

In diesem Beispiel befinden sich 34% aller gezählten Kreuze auf Muskelfasern der Kategorie „Stadium 1“

Bei der Methode MA2 erleichtern der motorisierte Tisch sowie das festgelegte Punkteraster die Auswertung. Dagegen kann bei MA1 die Muskelbiopsie unter dem Lichtmikroskop ohne zusätzliches teures Equipment ausgewertet werden. Ein Nachteil bei MA2 ist allerdings, dass bei schwer betroffenen Fällen die stark pathologischen Muskelfasern oft vergrößert und aufgebläht sind und so von überproportional mehr Kreuzen bedeckt sind als die normal großen Muskelfasern. So kann es zu einer zu hohen Wertung dieser stark pathologischen Muskelfasern kommen.

3.4.2 Quantitative Analyse der Glykogenablagerungen und leeren Vakuolen in den Muskelfasern (MA3)

Bei der Analysemethode MA3 wurden die PAS positiven Ablagerungen (Glykogen) analysiert sowie zusätzlich die leeren Vakuolen, welche PAS negativen und Methylenblau negativen Arealen entsprechen. Dafür wurde wie bei Methode MA2 die Software „New CAST“ verwendet, um die auszuwertenden Schnitte in digitale Bilder umzuwandeln und mit einem Grid von jeweils 81 Punkten zu versehen. Somit ergibt sich hier der jeweils prozentuale Anteil an PAS positiver (glykogenhaltiger) Fläche, PAS negativer und Methylenblau positiver Fläche und vakuolierter Fläche (PAS und Methylenblau negativer Fläche).

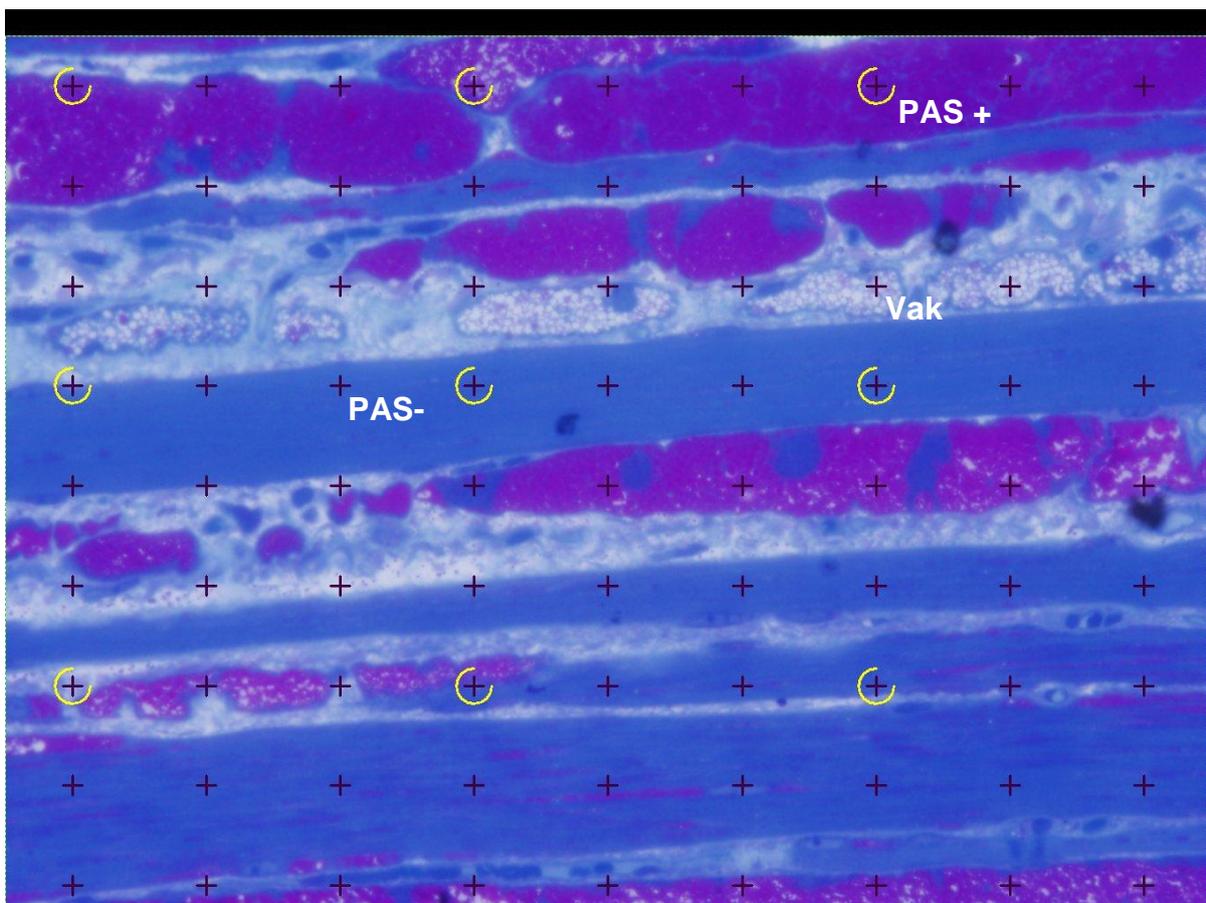


Abbildung 15: PAS gefärbter Semidünnschnitt: Auswertung MA3 mit Punkteraster (Vergrößerung x200)

Die Kreuze markieren die PAS positiven, PAS negativen (Methylenblau positiven) und vakuolisierte (PAS und Methylenblau negativen) Bereiche. +Vak entspricht z.B. einem Kreuz, welches auf einer vakuolisierten Fläche liegt.

Beispiel für Auswertungsblatt 3:

Auswertung anhand des Punkterasters	Glykogenbeladung		
Pat.1 Biopsie 1 Pyramide 16	Erscheinungsbild: Nerven und Gefäße mit angeschnitten		
Faserschnitt: längs und quer gemischt	Vergrößerung 40 fach		
gefärbt am 21.08.2009	ausgewertet am 09.09.2009		
Bildnummer	Vakuolen	Gly +	Gly -
1	4	6	5
2	2	2	3
3	6	12	15
4	5	31	9
5	2	15	22
6	1	8	9
7	5	32	15
8	2	36	15
9	1	15	7
10	2	21	11
11	5	24	18
12	3	10	6
13	5	34	13
14	3	45	14
15	1	34	20
16	2	23	14
17	6	31	17
18	3	19	9
Total	58	398	222
Gesamtzahl der gewerteten Kreuze	678	678	678
Verhältnis	0,08554572	0,58702065	0,32743363
Prozent	9%	59%	33%

Tabelle 11: Beispiel des Glykogen- und Vakuolenanteils mit Auswertungsmethode MA3 (Pat. 1 Biopsie 1)

In dieser Probe liegen 59% aller gewerteten Kreuze auf PAS positiven Bereichen und 9% auf leeren Vakuolen, während nur 33% auf PAS negativen Flächen lagen.

Die folgende Tabelle (Tabelle 12) bietet einen Überblick über die ausgewerteten Muskelgewebsschnitte:

Verlaufsform	Patient- und Biopsienummer	Kryostat-schnitte (KS)	Semidünnschnitte (SD)	Anzahl Bilder KS	Anzahl Bilder SD	Besonderheiten
infantil	Pat.1 Biopsie 1	ja	ja (2 Pyr)	31	31	blass, schlechte Grenzen
	Pat.1 Biopsie 2	ja	ja (2 Pyr)	19	40	viel Bindegewebe, teils zerrissen
infantil	Pat.2 Biopsie 1	ja	ja (2 Pyr)	20	54	von BG und Fett durchzogen
	Pat. 2Biopsie 2	ja	ja (2 Pyr)	34	80	/
infantil	Pat.3 Biopsie 1	nein	ja (2 Pyr)	/	35	/
	Pat.3 Biopsie 2	ja	ja (2 Pyr)	26	35	starke Kaliberunterschiede
infantil	Pat.4	ja	ja (2 Pyr)	8	30	zerrissenes Gewebe, schlechte Grenzen
infantil	Pat.5	nein	ja (1 Pyr)	/	11	kleine Muskelfasern
infantil	Pat.6	nein	ja (2 Pyr)	/	40	/
infantil	Pat.7	ja	ja (3 Pyr)	13	39	blass, zerrissen, viel BG
infantil	Pat.8	nein	ja (2 Pyr)	/	33	stark unterschiedlich befallene Bereiche
infantil	Pat.9	nein	ja (2 Pyr)	/	31	viel Fett und BG
infantil	Pat.10	nein	ja (3 Pyr)	/	44	Streifen- und Fleckenartefakte
juvenil	Pat.11 Biopsie 1	ja	ja (5 Pyr)	17	67	viel BG und Fett, schwer von leere Vakuolen abzugrenzen, wenig Muskelfasern
	Pat.11 Biopsie 2	ja	ja (5 Pyr)	29	81	teils sehr blass
juvenil	Pat.12 Biopsie 1	ja	ja (3 Pyr)	18	36	/
	Pat.12 Biopsie 2	ja	ja (2 Pyr)	19	45	/
	Pat.12 Biopsie 3	nein	ja (2 Pyr)	/	32	viel Bindegewebe
juvenil		nein	ja (2 Pyr)	19	42	/
adult	Pat.14	nein	ja (2 Pyr)	/	29	viele Artefakte
adult	Pat.15	nein	ja (2 Pyr)	/	32	/
Kontrolle	Pat.16	nein	ja (2 Pyr)	/	32	/
Kontrolle	Pat.17	nein	ja (2 Pyr)	/	35	/
Kontrolle	Pat.18	nein	ja (2 Pyr)	/	26	viel BG, MF teils schwer voneinander abgrenzbar
Kontrolle	Pat.19	nein	ja (2 Pyr)	/	27	/

Tabelle 12: Anzahl der ausgewerteten Bilder und morphologischer Besonderheiten aller ausgewerteter Muskelgewebsschnitte

3.4.3 Etablierung eines morphologischen Index der pathologischen Veränderungen in den Skelettmuskelfasern für die Analysemethode MA1 und MA2

Zur besseren Darstellung der Ergebnisse der Auswertung der einzelnen Patienten und ihrer Muskelbiopsien wurde ein morphologischer Index (Mo-Index) eingeführt.

Der Mo-Index wurde entwickelt, um aus mehreren Prozentzahlen der einzelnen Muskelfaser Stadien (MA1 und MA2) einen einzelnen, übersichtlicheren Wert zu machen. Diese Zusammenfassung der vielen Analyseergebnisse zu einem Wert vereinfacht die statistische Berechnung der Werte.

Der **Mo-Index Gesamt** berechnet sich aus der Summe der prozentualen Ergebnisse aller einzelnen Stadien multipliziert mit ihren Stadienziffern. Hier an einem Beispiel berechnet:

Mo-Index Gesamt: $0\% \cdot 0 + 26\% \cdot 1 + 46\% \cdot 2 + 17\% \cdot 3 + 10\% \cdot 4 + 2\% \cdot 5 = 2,19$

Eine Hypothese dieser Arbeit ist, dass insbesondere die hochpathologischen Stadien (Stadien 4 und 5) relevant sind, sodass diese Stadien im **Mo-Index high** berechnet wurden: Hier beispielhaft berechnet:

Mo-Index high: $10\% \cdot 4 + 2\% \cdot 5 = 0,50$

Ein gesunder Mensch, der nur normale Muskelfasern im Stadium 0 in der Muskelbiopsie zeigt, kann einen Mo-Index Gesamt von 0 haben: $100\% \cdot 0 + 0\% \cdot 1 + 0\% \cdot 2 + 0\% \cdot 3 + 0\% \cdot 4 + 0\% \cdot 5 = 0,00$

Die Auswertung der Kontrollgruppe zeigte, dass dort der Mo-Index Gesamt zwischen 0,03 und 0,09 liegt. Denn auch bei Gesunden können geringe unspezifische PAS-Ablagerungen auftreten.

Ein Patient mit Morbus Pompe mit ausgeprägten pathologischen Veränderungen könnte theoretisch den höchst erreichbaren Wert von 5 haben: $0\% \cdot 0 + 0\% \cdot 1 + 0\% \cdot 2 + 0\% \cdot 3 + 0\% \cdot 4 + 100\% \cdot 5 = 5,00$

Der Mo-Index Gesamt bewegt sich also zwischen den Zahlen 0,00 und 5,00. Je höher der Wert, desto ausgeprägter sind die morphologischen Veränderungen der Skelettmuskulatur.

Die Mo-Indizes sind erstellbar anhand der Ergebnisse der Analysen MA1 und MA2.

Wenn Ergebnisse der Auswertung MA1 verwendet werden, bezieht sich der jeweilige %-Wert auf die Menge der Muskelfasern eines Stadiums/Gesamtmuskelfasermenge und bei MA2 bezieht sich der jeweilige %-Wert auf die Muskelfaserareale eines Stadiums/Gesamtmuskelfaserareale.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der morphologischen Auswertung der pathologischen Veränderungen der Muskelbiopsien (Färbemethoden)

Das Ziel der Vorversuche war es, einen bestmöglichen Kontrast der PAS-Färbung an den Muskelschnitten zu erreichen, um eine optimale morphologische Auswertung zu etablieren. Wichtig war die Etablierung der Färbungen auf alkoholischer Basis, da Glykogen wasserlöslich ist und durch wasserhaltige Färbemethoden aus den Zellen geschwemmt werden kann (siehe Kapitel 3.3.1).

Durch Versuche mit unterschiedlicher Einwirkdauer des Schiffschen Reagenz wurde, um das beste Färbeergebnis zu erzielen, eine Dauer von 10 min für Gefrierschnitte und 15 min für Paraffinschnitte festgelegt. Die Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylin, Methyleneblau (Löffler) und Richardson Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlicher Einwirkdauer ausprobiert. Der beste Blau-Violett-Kontrast wurde sowohl bei Kryostat- als auch bei Paraffinschnitten mit Richardson Lösung (Verhältnis 19:1) und einer einminütigen Einwirkdauer erzielt.

Kryostatschnitte liefern ein besseres Ergebnis als Paraffinschnitte und ein klareres Bild, vermutlich wegen einer stärker ausgeprägten Substanzflucht des Glykogens bei Paraffinschnitten. Diese ist laut Literatur bei alkoholbasierten Färbungen nicht vermeidbar (Mulisch et al., 2001). Aus diesem Grund fanden die Paraffinschnitte nach den Vorversuchen wegen zu großer Ungenauigkeit bei der Auswertung keine Berücksichtigung mehr.

Die Semidünnschnitte wurden zunächst nach der Färbeanleitung aus der Veröffentlichung von Colleen M. Lynch gefärbt (Lynch et al., 2005).

Das Ergebnis war nicht zufriedenstellend, da die violette PAS-Färbung durch den blauen Methylenfarbstoff stark überfärbt wurde. Ein gutes Ergebnis mit einem starken Blau-Violett-Kontrast zwischen den PAS-positiven und den PAS-negativen Bereichen ergab sich dann schließlich durch eine geänderte Reihenfolge der einzelnen Schritte sowie geänderter Einwirkzeiten (siehe Kapitel 3.3.4).

Anhand der Vorversuche und durch die unterschiedlichen Ergebnisse der Färbungen wurde entschieden, für die Auswertung der einzelnen Muskelbiopsien Kryostatschnitte und Semidünnschnitte zu verwenden. Bei den externen Fällen standen allerdings nur Kunstharzblöcke (Semidünnschnitte) zur Verfügung.

Aufgrund der großen Gewebsfläche der Kryostatschnitte wurde bei der Auswertung jeweils nur ein Schnitt pro Fall ausgewertet. Die angeschnittene Fläche der Semidünnschnitte ist dagegen sehr viel kleiner, deswegen wurden mindestens 2 Pyramiden ausgewertet. Bei einem Fall konnte wegen Gewebemangel nur eine Pyramide ausgewertet werden.

4.2 Ergebnisse der morphologischen Analysemethoden (MA1-MA3)

Die mit der modifizierten PAS Färbung angefertigten Kryostatschnitte (KS-PAS Dimedon) und Semidünnschnitte (SD-PAS) wurden mit unterschiedlichen morphologischen Analysemethoden untersucht.

4.2.1 Vergleich der Analysemethoden MA1 und MA2 an Kryostat- und Semidünnschnitten

In den Vorversuchen hat sich gezeigt, dass die PAS gefärbten SD-Schnitte distinktere Färbeergebnisse insbesondere geringer Glykogenablagerungen zeigen.

Die folgende Tabelle 13 und die Abbildung 16 vergleichen die Analysen der pathologischen Veränderungen (MA1 und MA2) an KS-PAS Dimedon und SD-PAS gefärbter Schnitte anhand einer leicht betroffenen Muskelbiopsie (Pat.2 Biopsie 2, Mo-Index Gesamt=0,47).

Stadien	0	1	2	3	4	5
KS-PAS Dimedon MA1 (in % der Muskelfasern)	14%	69%	4%	2%	8%	4%
KS-PAS Dimedon MA2 (in % der Kreuze)	8%	67%	9%	8%	7%	2%
SD-PAS						
MA1 (in % der Muskelfasern)	90%	4%	0%	1%	3%	2%
MA2 (in % der Kreuze)	79%	13%	1%	0%	3%	4%

Tabelle 13: Vergleich der morphologischen Stadieneinteilung nach MA1 und MA2 an KS-PAS Dimedon und SD-PAS gefärbten Schnitten einer leicht betroffenen Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.2 Biopsie 2; Mo-Index Gesamt=0,47).

Die geringeren Veränderungen (Stadium 0 und 1) werden in den PAS-SD Schnitten besser erfasst als in den KS-PAS Schnitten. In den höheren Stadien (2-5) zeigt sich kein großer Unterschied zwischen den verschiedenen Färbemethoden.

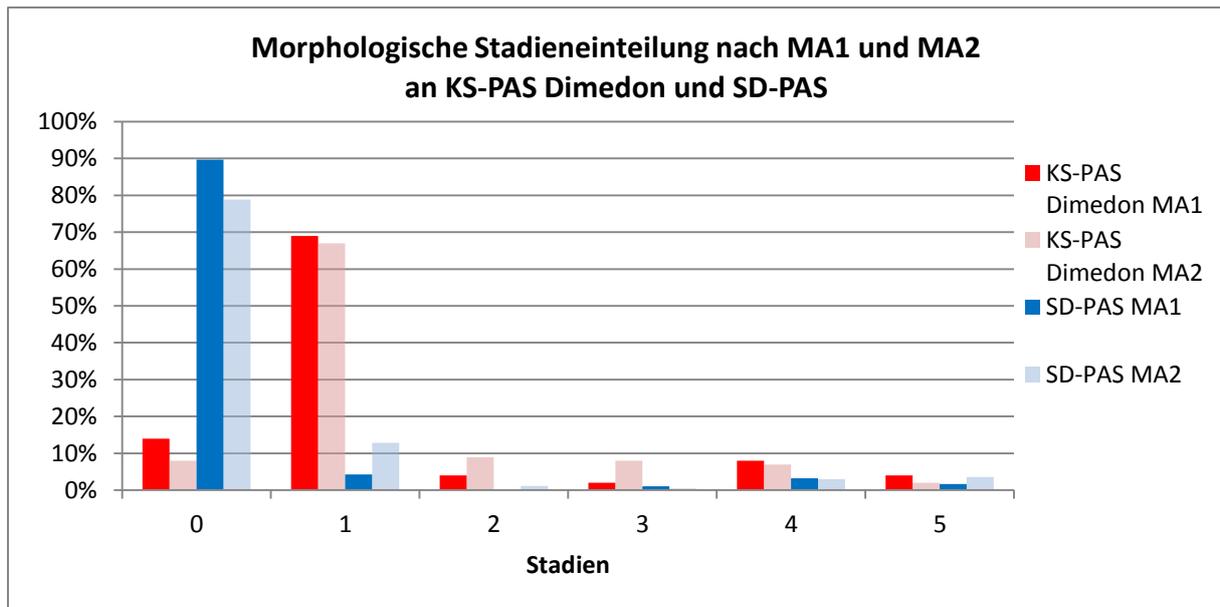


Abbildung 16: Graphische Darstellung des Vergleichs der morphologischen Stadieneinteilung nach MA1 und MA2 an KS-PAS Dimedon und SD-PAS einer Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.2 Biopsie 2) mit leichtgradigen morphologischen Veränderungen (Mo-Index Gesamt=0,47).

Die geringeren Veränderungen (Stadium 0 und 1) werden in den PAS-SD Schnitten besser erfasst als in den KS-PAS Schnitten. In den höheren Stadien (2-5) zeigt sich kein großer Unterschied zwischen den verschiedenen Färbemethoden. Auch zwischen den Analysemethoden MA1 und MA2 sind insbesondere in den höheren Stadien keine deutlichen Unterschiede zu erkennen.

Die folgende Tabelle 14 und die Abbildung 17 vergleichen die Auswertungen MA1 und MA2 mit KS-PAS Dimedon und SD-PAS anhand einer stark betroffenen Muskelbiopsie (Pat. 3 Biopsie 2; Mo-Index Gesamt=3,38).

Stadien	0	1	2	3	4	5
KS-PAS Dimedon MA1 (in % der Muskelfasern)	0%	0%	2%	54%	21%	22%
KS-PAS Dimedon MA2 (in % der Kreuze)	0%	0%	3%	67%	14%	16%
SD-PAS						
MA1 (in % der Muskelfasern)	0%	3%	24%	43%	13%	16%
MA2 (in % der Kreuze)	0%	2%	19%	35%	29%	15%

Tabelle 14: Graphische Darstellung des Vergleich der morphologischen Stadieneinteilung nach MA1 und MA2 an KS-PAS Dimedon und SD-PAS gefärbten Schnitte einer Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.3 Biopsie 2; Mo-Index Gesamt=3,38).

Die mittleren Veränderungen (Stadium 2) werden in den PAS-SD Schnitten besser erfasst als in den KS-PAS Schnitten. In den höheren Stadien (4 und 5) zeigt sich kein großer Unterschied zwischen den verschiedenen Färbemethoden.

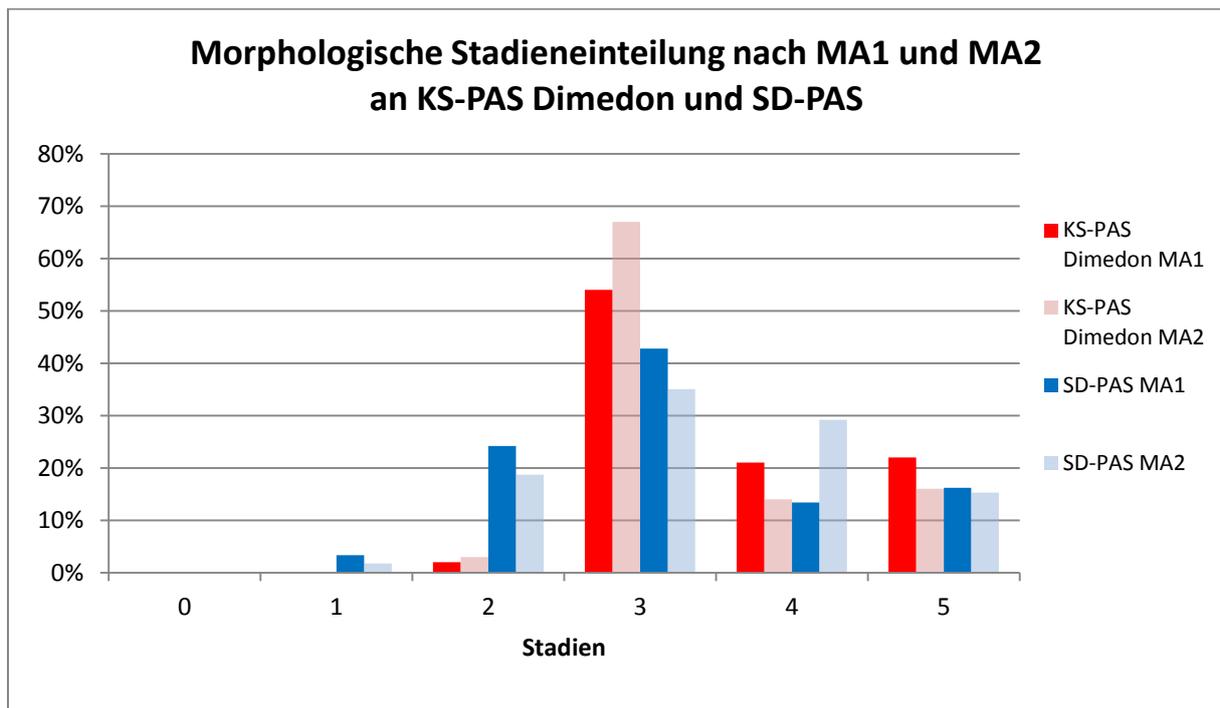


Abbildung 17: Vergleich der morphologischen Stadieneinteilung nach MA1 (in Prozent der Muskelfasern) und MA2 (in Prozent der Kreuze) an KS-PAS Dimedon und SD-PAS einer Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.3 Biopsie 2) mit starken morphologischen Veränderungen (Mo-Index Gesamt=3,38).

Die mittleren Veränderungen (Stadium 2) werden in den PAS-SD Schnitten besser erfasst als in den KS-PAS Schnitten. In den höheren Stadien (4 und 5) zeigt sich kein großer Unterschied zwischen den verschiedenen Färbemethoden.

Zusammenfassend zeigt sich im Vergleich der beiden **Färbetechniken**, dass sich bei den niedrigeren Stadien (Stadium 0 und 1) ein Unterschied zwischen KS-PAS Dimedon Schnitten und SD-PAS Schnitten feststellen lässt. Aufgrund des feineren Zellbildes und der „saubereren“ Färbung kommen geringe PAS positiven Einschlüsse in den SD-PAS Schnitten besser zur Geltung. Die KS-PAS Dimedon Schnitte zeigen mehr unspezifisch PAS positiv angefärbte, nicht pathologische, Bereiche (Färbeartefakte). Bei den höhergradigen Stadien (3-5) zeigt sich kein Unterschied zwischen den Färbemethoden. Die SD-PAS Schnitte sind somit vor allem für die Analyse von gering pathologisch veränderten Muskelfasern gut geeignet, da die niedrigen Stadien in diesen Schnitten genauer zu differenzieren sind. Die stark pathologischen Veränderungen, insbesondere die Vakuolen, sind in beiden Färbemethoden gut erkennbar. Aus den genannten Gründen werden im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch Ergebnisse, die anhand der SD-PAS Schnitte erhoben wurden, dargestellt.

Zusammenfassend im Vergleich der beiden **Analysemethoden MA1 und MA2** zeigen sich keine größeren Unterschiede der Ergebnisse. Die Analyse der einzelnen Muskelbiopsien hat gezeigt, dass bei geringgradig veränderten Muskelbiopsien ohne große Kaliberschwankungen kein Unterschied in den Ergebnissen von MA1 und MA2 ist. Bei schwer betroffenen Muskelbiopsien kann sich theoretisch ein erhöhter Anteil an schwer pathologischen Stadien bei MA2 zeigen, da stark pathologische Muskelfasern oft vergrößert und aufgebläht sind und so von überproportional mehr Kreuzen bedeckt sind als die normal großen Muskelfasern. So kann es theoretisch zu einer zu hohen Wertung dieser stark pathologischen Muskelfasern bei MA2 kommen.

In den beiden oben gezeigten Beispielen (Patienten 2 und 3) zeigten sich jedoch sowohl bei dem leicht als auch bei dem schwer betroffenen Fall jeweils keine großen Unterschiede zwischen den Ergebnissen von MA1 und MA2.

4.2.2 Vergleich der Analyse der Glykogenablagerungen und leeren Vakuolen (MA3) an Kryostat- und Semidünnschnitten

Die folgende Tabelle 15 und die Abbildung 18 vergleichen die Analysemethode MA3 der KS-PAS Dimedon Schnitte und SD-PAS Schnitte anhand einer leicht pathologischen Muskelbiopsie (Pat.2 Biopsie 2). Bei der Analyse MA3 wurden die auf den Muskelfasern liegenden Kreuze in PAS negativ + Methylenblau positive (normale Muskelfasern), PAS positive und vakuolisierte (PAS und Methylenblau negative) eingeteilt und ausgewertet.

	PAS negativ (PAS-/MB+)	PAS positiv (PAS+)	Leere Vakuolen (PAS-/MB-)
KS-PAS Dimedon			
MA3 (in % der Kreuze)	79%	13%	8%
SD-PAS			
MA3 (in % der Kreuze)	92%	3%	6%

Tabelle 15: Vergleich der PAS-Ablagerungen bzw. leere Vakuolen nach MA3 an KS-PAS Dimedon und SD-PAS einer Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.2 Biopsie 2) mit leichtgradigen morphologischen Veränderungen.

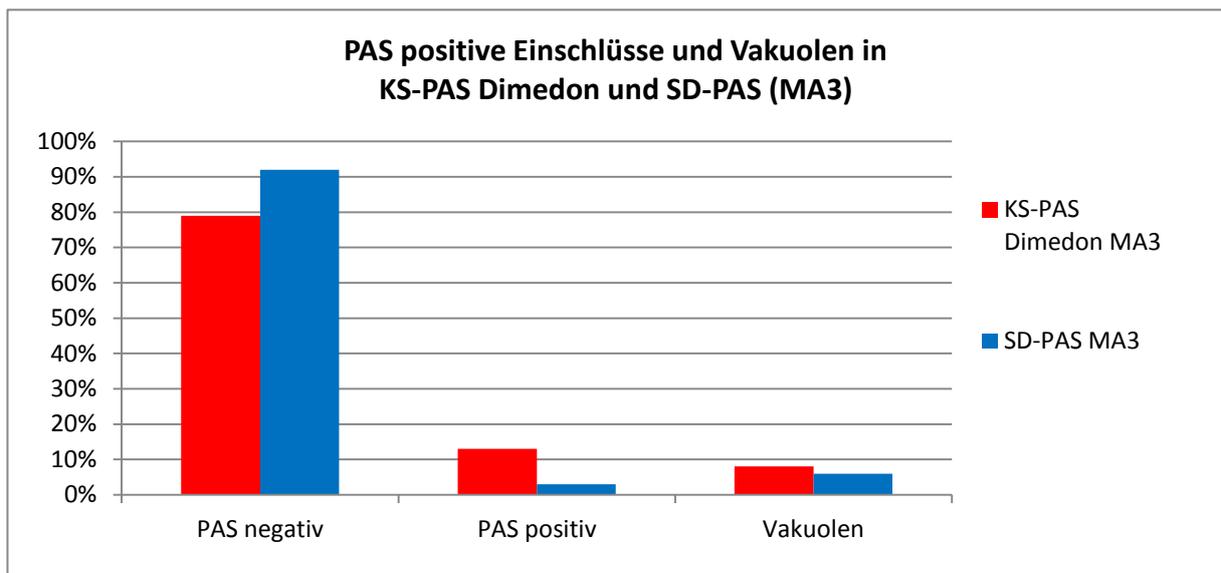


Abbildung 18: Graphische Darstellung der PAS-Ablagerungen und Vakuolen an KS-PAS Dimedon und SD-PAS einer Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.2 Biopsie 2) mit leichtgradigen morphologischen Veränderungen.

In den Kryostatschnitten (KS-PAS) kommen im Vergleich zu den SD-PAS Schnitten mehr Glykogenablagerungen zur Darstellung, möglicherweise auf Grund von Überfärbung.

Die folgende Tabelle 16 und die Abbildung 19 vergleichen die Analysemethode MA3 der KS-PAS Dimedon Schnitte und SD-PAS Schnitte anhand einer stark pathologischen Muskelbiopsie (Pat.3 Biopsie 2).

	PAS negativ (PAS-/MB+)	PAS positiv (PAS+)	Leere Vakuolen (PAS-/MB-)
KS-PAS Dimedon			
MA3 (in % der Kreuze)	4%	66%	30%
SD-PAS			
MA3 (in % der Kreuze)	10%	49%	41%

Tabelle 16: Vergleich der PAS-Ablagerungen bzw. Vakuolen nach MA3 an KS-PAS Dimedon und SD-PAS einer Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.3 Biopsie 2) mit starken morphologischen Veränderungen.

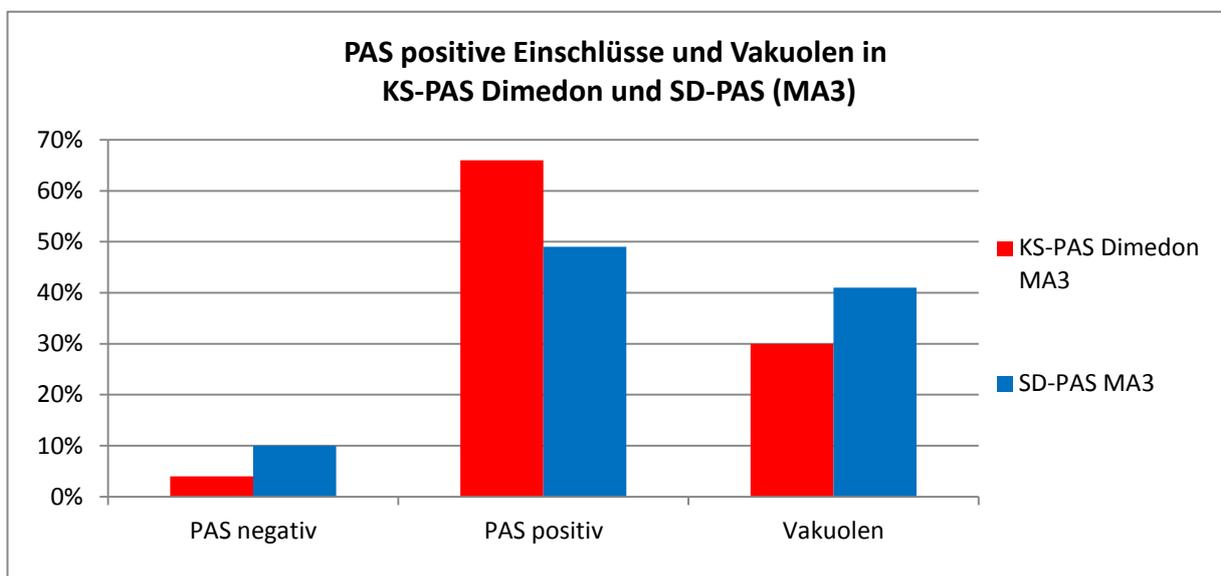


Abbildung 19: Vergleich der PAS-Ablagerungen und Vakuolen nach MA3 (in Prozent der Kreuze) an KS-PAS Dimedon und SD-PAS einer Muskelbiopsie eines stark betroffenen Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.3 Biopsie 2) mit starken morphologischen Veränderungen.

In den Kryostatschnitten (KS-PAS) kommen im Vergleich zu den SD-PAS Schnitten mehr Glykogenablagerungen zur Darstellung.

Zusammenfassend zeigt sich, dass bei den KS-PAS Schnitten prozentual mehr Glykogenablagerungen gemessen werden als bei den SD-PAS Schnitten. Möglicherweise ist hierfür eine Überfärbung der Kryostatschnitte verantwortlich.

In Zusammenschau der genannten Ergebnisse in den Kapiteln 4.1 und 4.2 werden in der weiteren Auswertung ausschließlich die Ergebnisse der Semidünnschnitte (SD-PAS Schnitte) mit der Software unterstützten Analysemethode 2 (MA2) und 3 (MA3) verwendet.

4.3 Morphologische Veränderungen von Muskelbiopsien der Patienten mit Morbus Pompe mit unterschiedlichem Ansprechen auf die Enzymersatztherapie (ERT)

Die Kinder wurden von den behandelnden Pädiatern anhand ihres klinischen Ansprechens (Response) auf der ERT in 3 Gruppen eingeteilt: Response 1 (R1): gutes Ansprechen auf die ERT bzw. normale Entwicklung, R2: mittleres Ansprechen bzw. klinische Verbesserung und R3: schlechtes Ansprechen bzw. keine klinische Verbesserung.

Die Ergebnisse der morphometrischen Analyse der Muskelbiopsien (Mo-Index) wurde mit dem Ansprechen auf die Therapie verglichen (Abbildung 20).

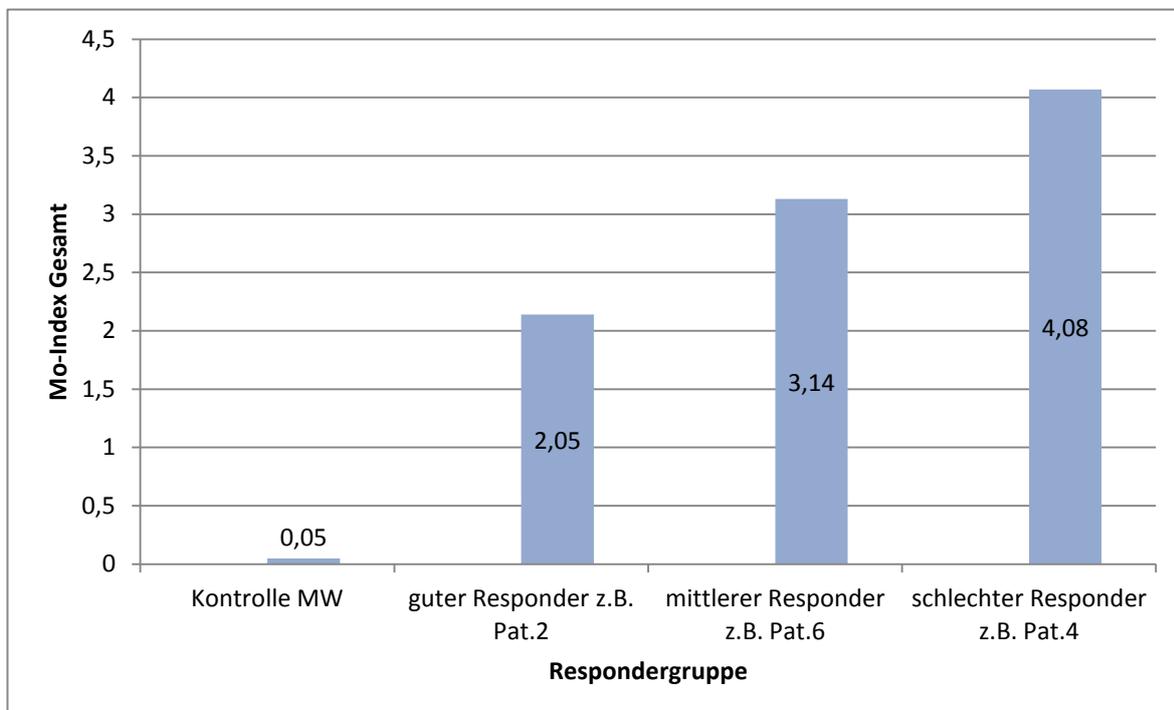


Abbildung 20: Vergleich der pathologischen Veränderungen der Skelettmuskulatur (Mo-Index Gesamte) der Kontrollgruppe und Patienten mit Morbus Pompe mit einem unterschiedlichen Response auf die ERT

4.3.1 Einzelfallvorstellungen der untersuchten Muskelbiopsien der Patienten mit Morbus Pompe

Es wurden insgesamt 13 Fälle untersucht (10 infantile und 3 juvenile). 5 Rebiopsien wurden unter ERT und bei 3 Fällen wurde die initiale Biopsie erst unter ERT entnommen (siehe Tabelle 7 in Kapitel 3.1). Diese Muskelbiopsien wurden anhand ihrer Mo-Indizes, der PAS-Positivität und der Vakuolisierung mit dem klinischen Ansprechen (Response) verglichen.

Die folgenden zwei Hypothesen sollen untersucht werden:

1. Die Ergebnisse der morphologischen Analyse der Biopsien unter ERT zeigen den Erfolg der ERT (Response) an.
2. Die Ergebnisse der morphologischen Analyse der initialen Biopsie vor ERT ist hinweisend auf den Erfolg bzw. das Ansprechen der ERT (prädiktiver Marker).

In den folgenden Darstellungen (Abbildung 21 bis Abbildung 28) werden einige der untersuchten Fälle einzeln vorgestellt.

4.3.1.1 Fallbeispiel 1: Infantiler Patient mit gutem klinischen Ansprechen (R1) auf die ERT mit Rebiopsie (Pat. 2)

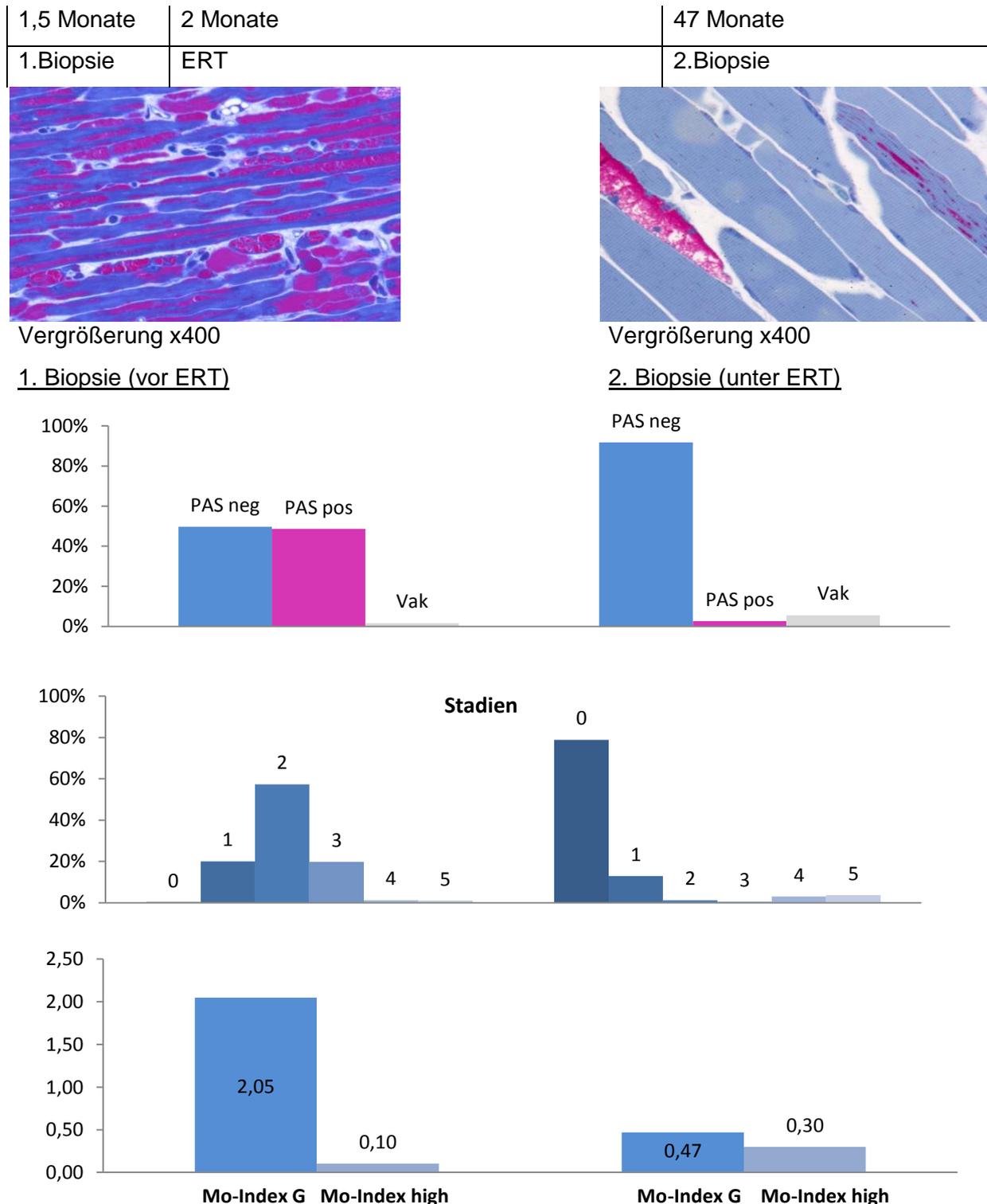
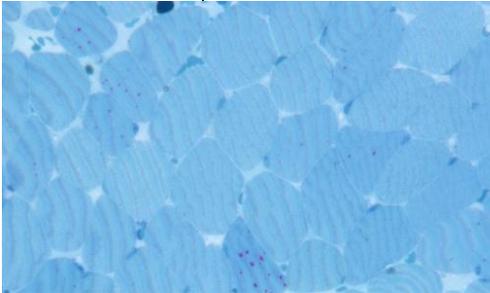


Abbildung 21: Infantiler Patient mit gutem klinischen Ansprechen auf die ERT (R1) (Pat. 2; Biopsie 1 und 2)

Dieser infantile Patient mit gutem klinischen Ansprechen (R1) zeigt in der Muskelbiopsie eine gute Glykoclearance, das heißt die PAS positiven Anteile sind in der zweiten Biopsie unter ERT niedriger als in der ersten Biopsie. Es zeigt sich ein deutlicher Rückgang der Muskelfasern in den Stadien 2 und 3 und eine Zunahme der gesunden Fasern (Stadium 0). Der Mo-Index Gesamt sinkt entsprechend deutlich unter ERT.

4.3.1.2 Fallbeispiel 2: Infantiler Patient mit gutem klinischen Ansprechen (R1) auf die ERT (Pat.10)

2 Monate	24 Monate
ERT	1. Biopsie



Vergrößerung x400

1. Biopsie (unter ERT)

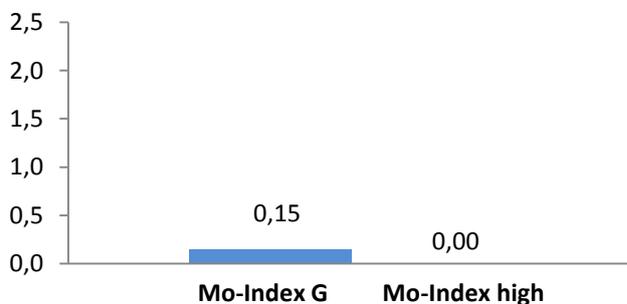
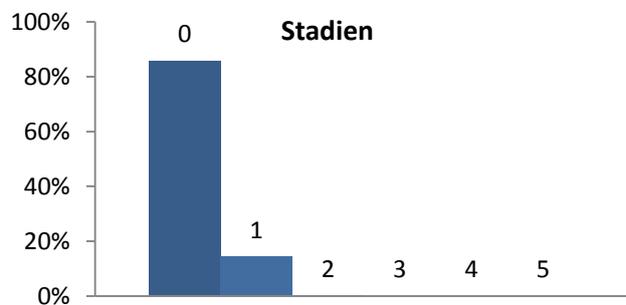
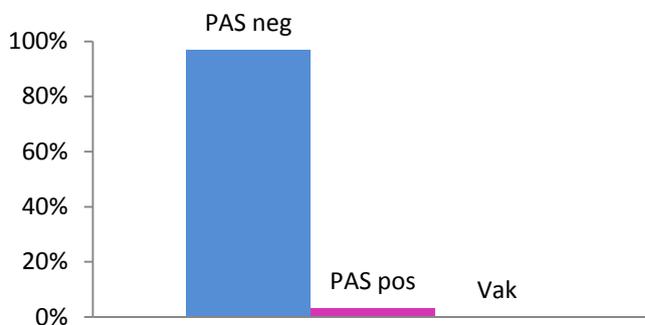


Abbildung 22: Infantiler Patient mit gutem klinischen Ansprechen auf die ERT (R1) (Pat.10)

Die Muskelbiopsie wurde unter ERT entnommen. Es zeigen sich überwiegend gesunde Fasern (Stadium 0) und Fasern mit geringgradigen Veränderungen (Stadium 1), sowie geringe PAS positive Ablagerungen. Entsprechend niedrig ist der Mo-Index.

4.3.1.3 Fallbeispiel 3: Juveniler Patient mit gutem klinischen Ansprechen (R1) auf die ERT mit 2 Rebiopsien (Pat.12)

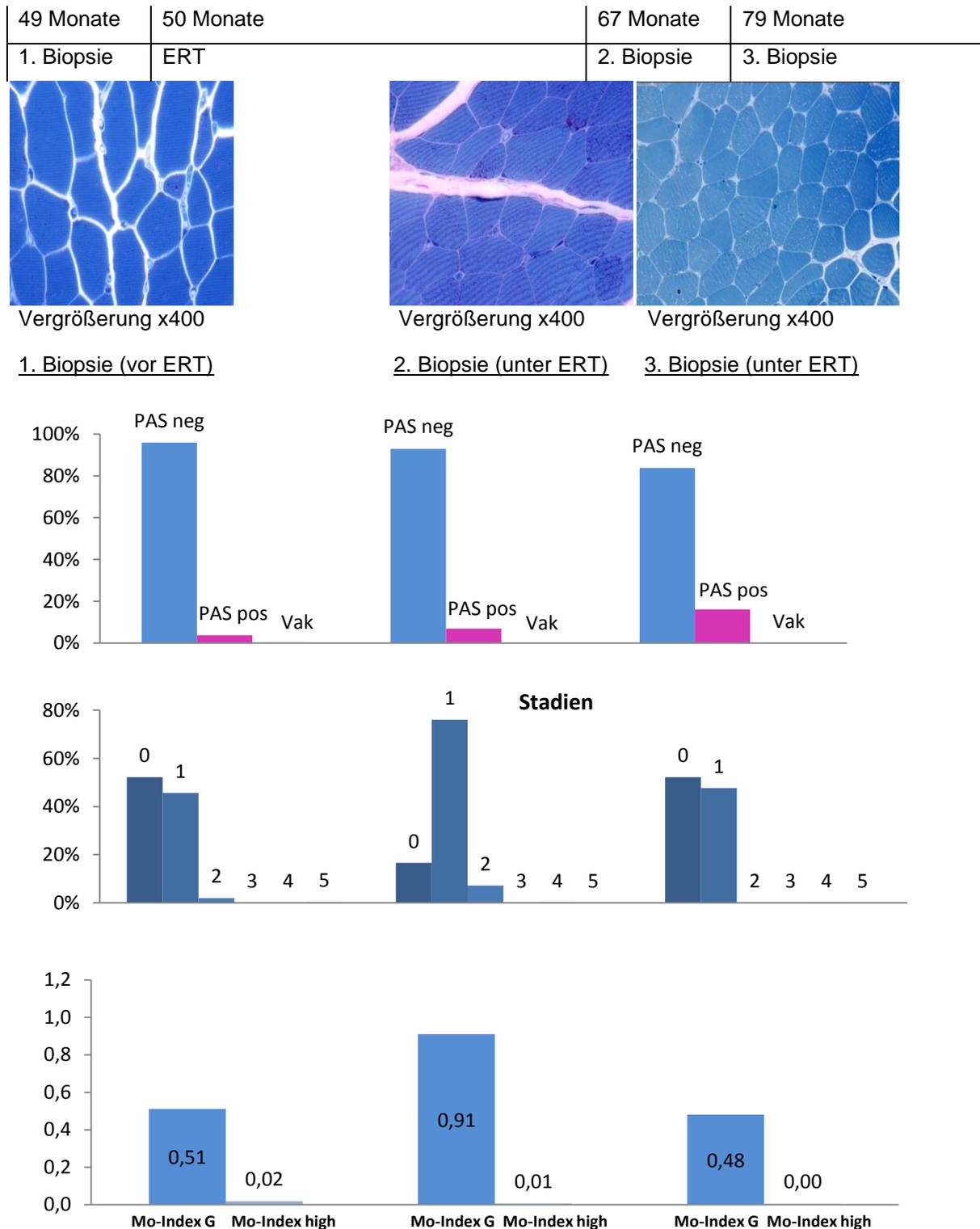
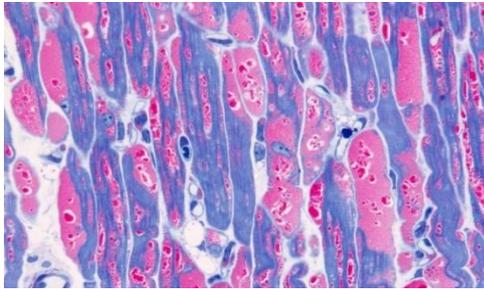


Abbildung 23: Juveniler Patient mit gutem klinischen Ansprechen auf die ERT (R1) (Pat.12, Biopsie 1-3)

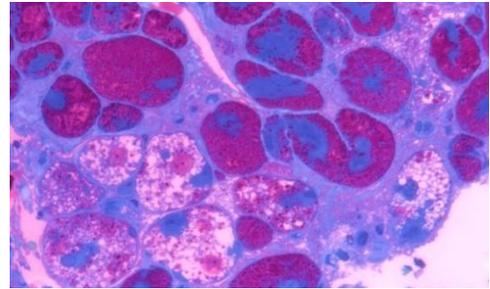
In den Muskelbiopsien des juvenilen Patienten mit gutem klinischen Ansprechen (R1) zeigt sich unter ERT eine kurzfristige Abnahme, dann aber wieder eine Zunahme, der gesunden Muskelfasern. Entsprechend niedrig ist der Mo-Index. Der Anteil der leicht pathologischen Stadien 1-2 erhöht sich leicht. Der Anteil an PAS positiven Anteilen steigt gering unter der ERT.

4.3.1.4 Fallbeispiel 4: Infantiler Patient mit mittlerem klinischen Ansprechen (R2) auf die ERT mit Rebiopsie (Pat.1)

3 Monate	3,5 Monate	18 Monate	37 Monate
1. Biopsie	ERT	2. Biopsie	Tod



Vergrößerung x400



Vergrößerung x400

1. Biopsie (vor ERT)

2. Biopsie (unter ERT)

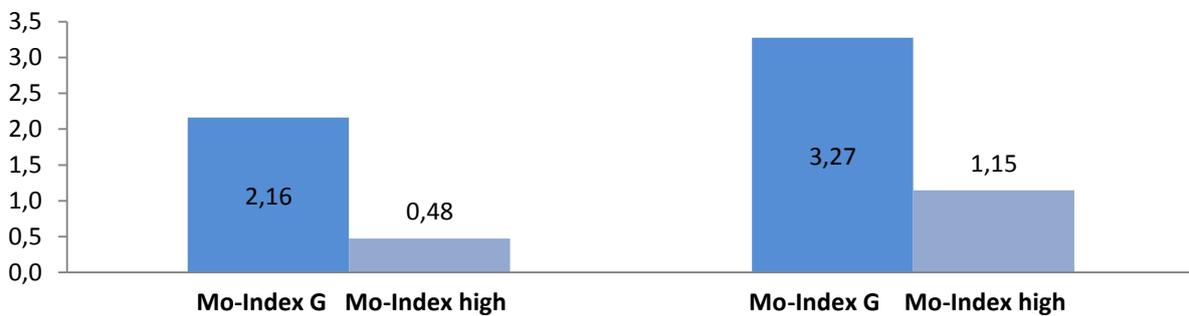
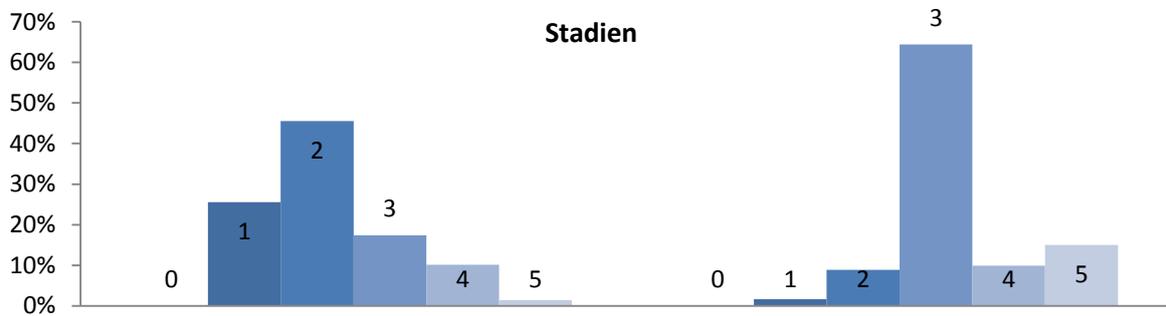
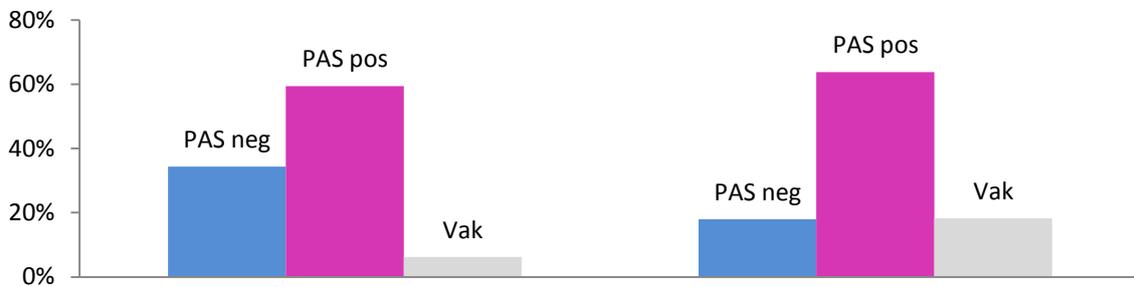


Abbildung 24: Infantiler Patient mit mittlerem klinischen Ansprechen auf die ERT (R2) (Pat.1 Biopsie 1 und 2)

Bei dieser Patientin mit mittlerem Ansprechen auf die ERT zeigt sich eine Zunahme vor allem der stark pathologischen Stadien (3-5), sowie eine Zunahme der PAS positiven Anteile und insbesondere der vakuolisierten Anteile unter ERT. Entsprechend findet sich eine Zunahme der Mo-Indizes.

4.3.1.5 Fallbeispiel 5: Infantiler Patient mit mittlerem klinischen Ansprechen (R2) auf die ERT mit Rebiopsie (Pat.3)

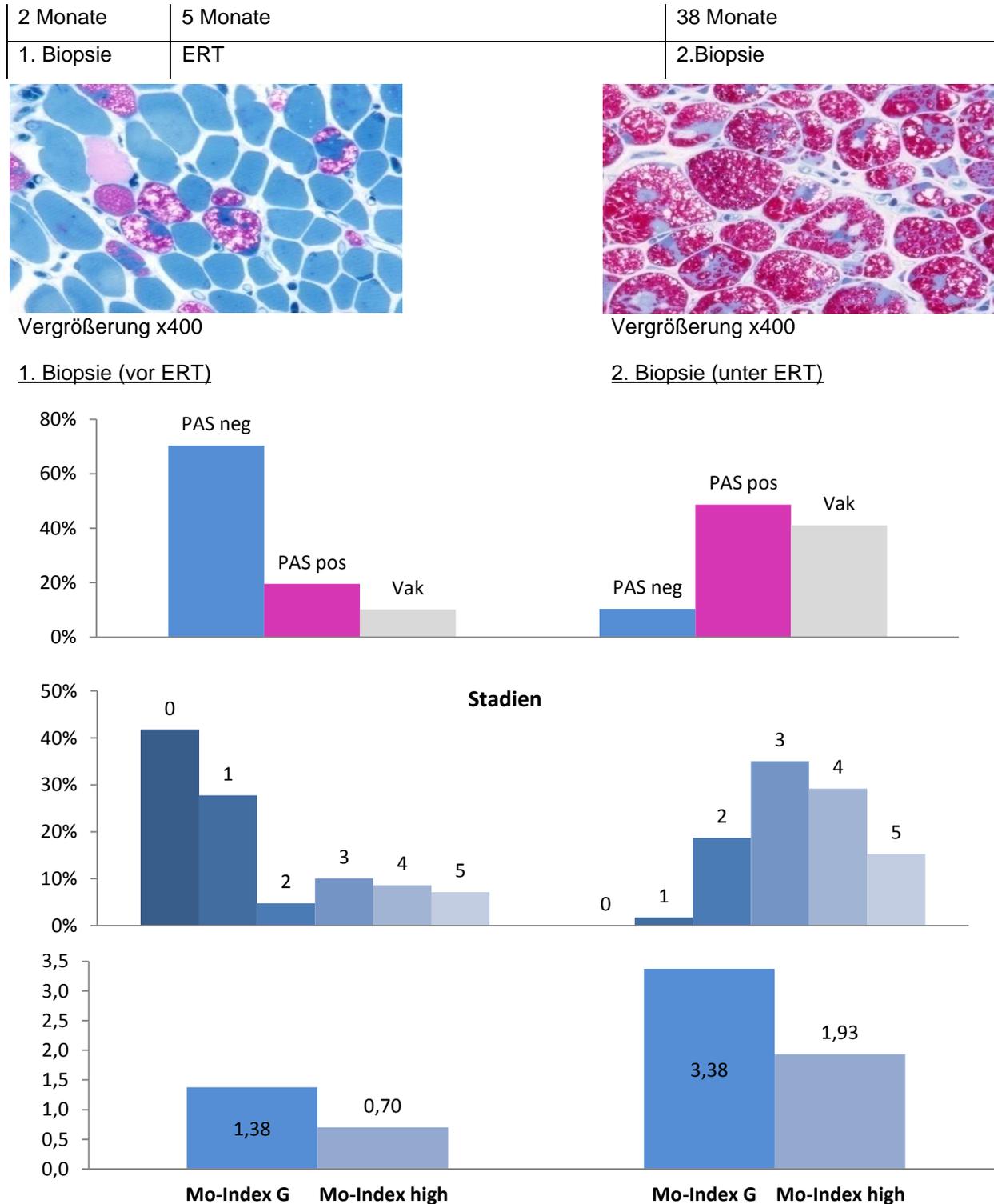


Abbildung 25: Infantiler Patient mit mittlerem klinischen Ansprechen auf die ERT (R2) (Pat.3; Biopsie 1 und 2)

Bei diesem Patienten zeigen sich sowohl eine Zunahme der pathologischen Stadien, sowie eine deutliche Zunahme der PAS positiven und der vakuolisierten Anteile unter ERT. Somit besteht eine schlechte Glykogen clearance. Entsprechend findet sich eine Zunahme der Mo-Indizes.

4.3.1.6 Fallbeispiel 6: Juveniler Patient mit mittlerem klinischen Ansprechen (R2) auf die ERT mit Rebiopsie (Pat.11)

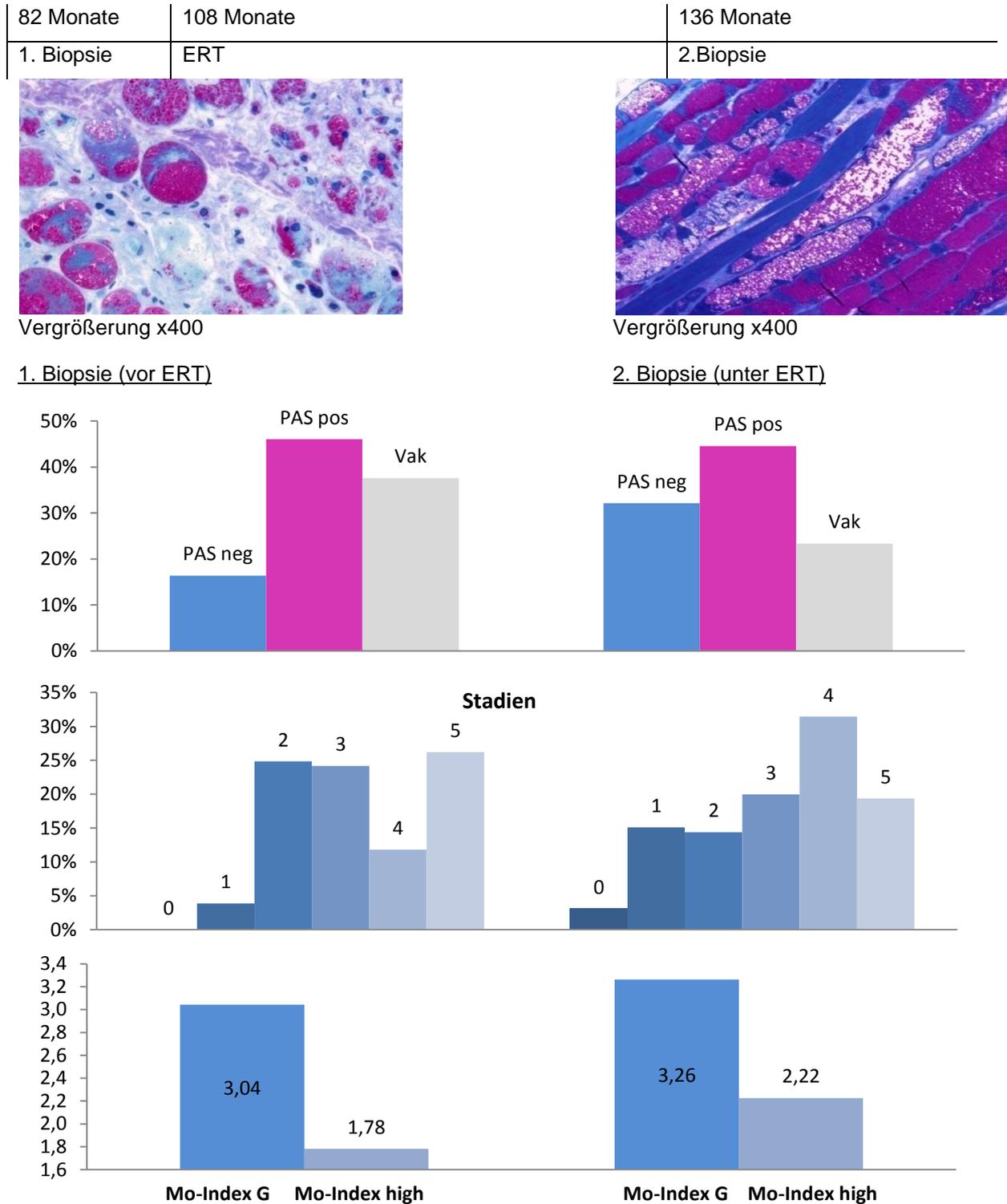
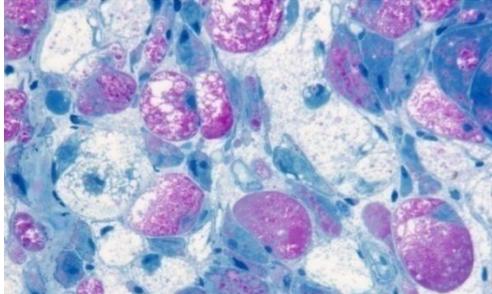


Abbildung 26: Juveniler Patient mit mittlerem klinischen Ansprechen auf die ERT (R2) (Pat.11; Biopsie 1 und 2)

In den Muskelbiopsien dieses Patienten zeigt sich eine gute Glykogen clearance und Verminderung der vakuolisierten Bereiche unter ERT. Allerdings bestand bei diesem Patienten bereits vor ERT ein großer Anteil an pathologisch stark veränderten Muskelfasern und Anteil der leeren Vakuolen. Der Mo Index ist bereits initial sehr hoch und verändert sich kaum unter Therapie.

4.3.1.7 Fallbeispiel 7: Infantiler Patient mit schlechtem klinischen Ansprechen (R3) auf die ERT (Pat.8)

4 Monate	26 Monate
ERT	1. Biopsie



Vergrößerung x400

1. Biopsie (unter ERT)

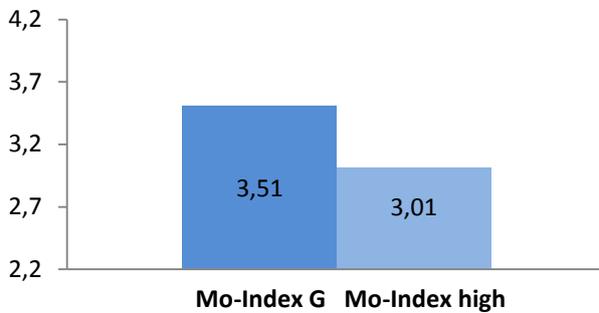
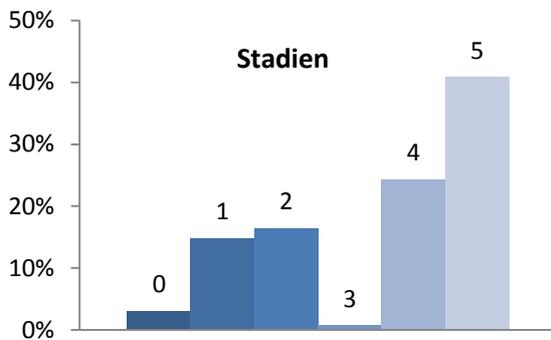
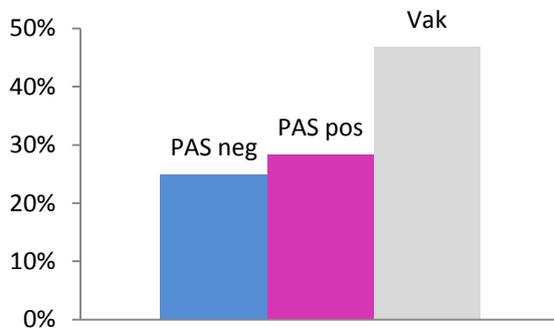
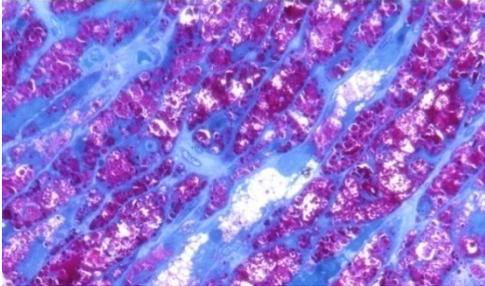


Abbildung 27: Infantiler Patient mit schlechtem klinischen Ansprechen auf die ERT (R3) (Pat.8)

Die Muskelbiopsie wurde unter ERT entnommen. Es zeigt sich jedoch ein großer Anteil der Stadien 4 und 5, währenddessen nur ein kleiner Anteil der Stadien 0 und 1 vorhanden ist mit entsprechend hohem Mo-Index. Auch der Anteil PAS positiver und vakuolisierter Fläche ist hoch.

4.3.1.8 Fallbeispiel 8: Infantiler Patient mit schlechtem klinischen Ansprechen (R3) auf die ERT (Pat.4)

2,5 Monate	10 Monate	12 Monate
ERT	1. Biopsie	Tod



Vergrößerung x400

1. Biopsie (unter ERT)

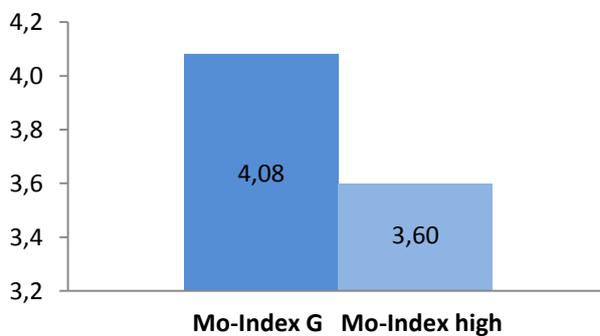
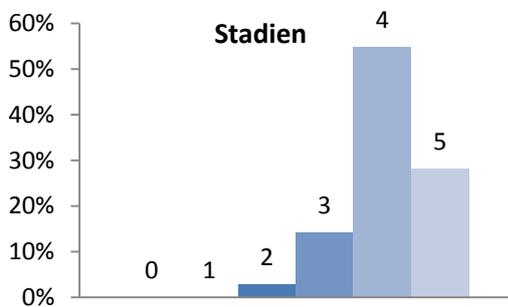
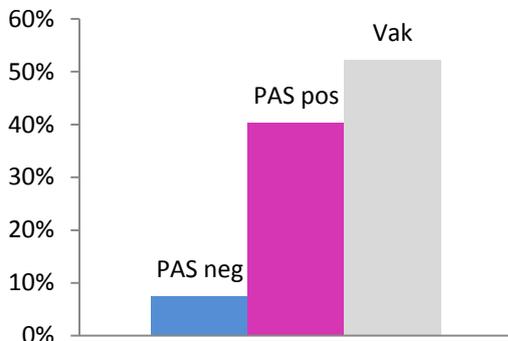


Abbildung 28: Infantiler Patient mit schlechtem klinischen Ansprechen auf die ERT (R3) (Pat.4)

Die Muskelbiopsie wurde unter ERT entnommen. Es zeigt sich ein großer Anteil der Stadien 4 und 5, währenddessen nur ein kleiner Anteil der Stadien 0 und 1 besteht mit entsprechend hohem Mo-Index. Die Anteile an PAS positiver und vakuolierter Fläche sind hoch.

Zusammenfassend zeigt sich an den **Einzelfallbeispielen** von Patienten mit einem unterschiedlichen Response auf die ERT, dass Patienten mit einem guten klinischen Response eine gute Glykogen Clearance zeigen, sowie eine Verminderung der morphologischen Indizes.

Patienten mit einem schlechteren klinischen Ansprechen zeigen unter Therapie eine schlechtere Glykogen Clearance sowie einen Anstieg der morphologischen Indizes.

Patienten mit schlechtem Ansprechen auf die ERT haben initial bereits einen hohen morphologischen Index und hohe Glykogenablagerungen.

4.4 Ergebnisse der morphologischen Veränderungen der Muskelbiopsien von kindlichen Patienten mit Morbus Pompe und der Kontrollgruppe

Es wurden insgesamt 13 Fälle mit Morbus Pompe untersucht (10 infantile und 3 juvenile), darunter waren 5 Rebiopsien unter ERT und 3 initiale Biopsien unter ERT. In der Kontrollgruppe wurden 4 Patienten untersucht.

Die nachfolgende Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse aller in der Arbeit ausgewerteten Muskelbiopsien geordnet nach der Verlaufsform.

Pat.	Biopsie-nummer	Verlaufsform	m/w	Lokalisation der Biopsie	Rebiopsie	Alter bei ERT-Beginn (Mon.)	Alter bei Biopsie (Mon.)	Response (Ansprechen auf ERT)	Mo-Index Gesamt	Mo-Index high	PAS pos. in %	Vak. in %	PAS pos. + Vak. in %
Pat. 1	Biopsie 1	infantil	w	MVL	ja	4	2	2	2,16	0,48	59,44	6,22	65,67
	Biopsie 2			MVL			34		3,27	1,15	63,78	18,3	82,08
Pat. 2	Biopsie 1	infantil	w	MVL	ja	10	1,5	1	2,05	0,1	48,65	1,66	50,35
	Biopsie 2			MVL			47		0,47	0,3	2,66	5,56	8,22
Pat. 3	Biopsie 1	infantil	m	MVL	ja	5	2	2	1,38	0,7	19,52	10,15	29,62
	Biopsie 2			MVL			38		3,38	1,93	48,64	41,02	89,66
Pat.4*		infantil	m	MVL		2,5	10	3	4,08 *	3,60 *	40,32*	52,22*	92,52*
Pat.5		infantil	w	MVL		5	4,5	3	1,72	0,64	26,88	9,88	36,78
Pat.6		infantil	w	MVL		22,5	19	2	3,14	2,44	38,47	25,86	64,37
Pat.7		infantil	m	MVL		4,5	4,5	2	3,49	2,65	31,37	38,05	69,47
Pat.8*		infantil	m	MVL		4	26	3	3,51 *	3,01 *	28,37*	46,75*	75,17*
Pat.9		infantil	w	MVL		10	9	3	3,74	3,03	43,05	43,23	86,25
Pat.10*		Infantil	w	MVL		2	24	1	0,15 *	0,00 *	3,05*	0,00*	3,05*
n=10													
Pat.11	Biopsie 1	juvenil	w	MVL	ja	108	82	2	3,04	1,78	46,02	37,59	83,61
	Biopsie 2			MTA			136		3,26	2,22	44,53	23,35	67,88
Pat.12	Biopsie 1	juvenil	m	MVL	ja	50	49	1	0,51	0,02	3,72	0,36	4,08
	Biopsie 2			MQF			61		0,91	0,01	6,93	0,05	6,98
	Biopsie 3			MQF			73		0,48	0	16,11	0	16,11

Pat.	Biopsie- nummer	Verlaufs- form	m/w	Lokalisation der Biopsie	Rebiopsie	Alter bei ERT-Beginn (Mon.)	Alter bei Biopsie (Mon.)	Response (Ansprechen auf ERT)	Mo-Index Gesamt	Mo-Index high	PAS pos. in %	Vak. in %	PAS pos. + Vak. in %
Pat.13		juvenil	w	MVL		4	4	1	1,04	0	8,63	0	8,63
n=3													
Pat.16		Kontrolle	w	MVL		/	26	/	0,04	0	1,21	0	1,21
Pat.17		Kontrolle	m	MVL		/	14	/	0,04	0	1,07	0	1,07
Pat.18		Kontrolle	w	MVL		/	16	/	0,03	0	1,32	0	1,32
Pat.19		Kontrolle	m	MVL		/	114	/	0,09	0	2,36	0	2,36
n=4													

Tabelle 17: Zusammenfassung der Daten aller ausgewerteten Muskelbiopsien von Patienten mit Morbus Pompe mit unterschiedlicher Verlaufsform

Bei den Fällen mit * wurde die initiale Biopsie erst ERT entnommen. MVL = M. vastus lateralis, MQF = M. quadizeps femoris, MTA = M. tibialis anterior.

4.5 Morphologische Veränderungen initialer Muskelbiopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit infantiler oder juveniler Verlaufsform

Die folgenden Diagramme (Abbildung 29 bis Abbildung 32) zeigen die Ergebnisse der initialen Muskelbiopsien der Kontrollgruppe, der infantilen und der juvenilen Patienten bezogen auf den Mo-Index Gesamt, Mo-Index high, PAS-Positivität und Vakuolen. Davon wurde bei 3 Patienten die initiale Biopsie erst unter ERT entnommen (siehe Tabelle 17, Patienten mit *).

Es wurde die Signifikanz der Mo-Indizes, der Anteile der PAS-Positivität und der vakuolisierten Anteile der Biopsien der verschiedenen Gruppen (infantil, juvenil und control) sowie der verschiedenen Responsegruppen (R1, R2, R3) vor und unter ERT untersucht. Es wurde ein unpaariger (unpaired) einseitiger (one-tailed) T-Test in einem Konfidenzintervall von 95% durchgeführt. Das Ergebnis wurde in signifikant ($p \leq 0,05$ (*)), sehr signifikant ($p \leq 0,01$ (**)) und hoch signifikant ($p \leq 0,001$ (***)) eingeteilt. Auf eine Korrektur des T-Tests durch eine vorherige Anova-Analyse bzw. eine Post-Hoc-Korrektur wurde aufgrund der geringen Fallanzahlen der einzelnen Gruppen (R1 mit $n=3$, R2 mit $n=5$ und R3 mit $n=2$) verzichtet. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism erstellt.

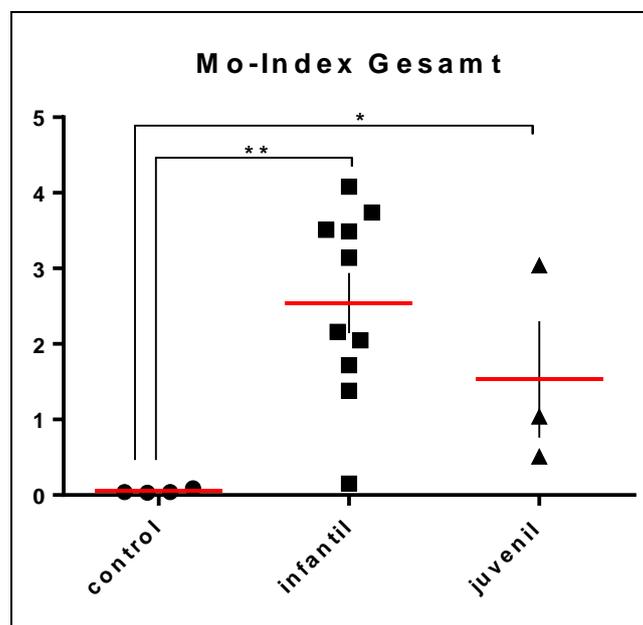


Abbildung 29: Mo-Index Gesamt der Muskelbiopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Pompe mit infantiler und juveniler Verlaufsform mit Mittelwert, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)

Der Mo-Index Gesamt (siehe Abbildung 29) der Kontrollgruppe ist sehr signifikant niedriger als der Mo-Index Gesamt der infantilen Patienten ($p=0,001$) und der juvenilen Patienten ($p=0,035$). Zwischen infantilen und juvenilen Patienten zeigt sich kein signifikanter

Unterschied ($p=0,125$), möglicherweise durch die niedrige Fallanzahl in der juvenilen Gruppe mit hohem Standardfehler ($SEM=\pm 0,7703$; $n=3$).

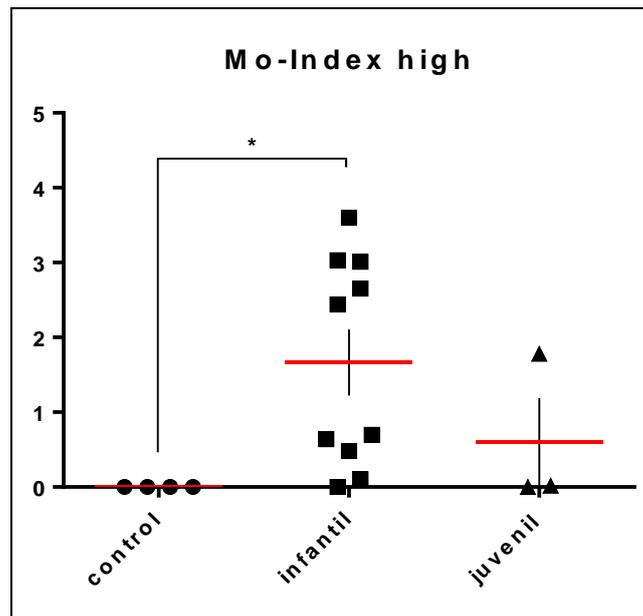


Abbildung 30: Mo-Index high der Muskelbiopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Pompe mit infantiler und juveniler Verlaufsform mit Mittelwert, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)

Der Mo-Index high (siehe Abbildung 30) der Kontrollgruppe ist signifikant niedriger als der der infantilen Patienten ($p=0,019$). Zwischen der Kontrollgruppe und den juvenilen Patienten ($p=0,139$) und zwischen den infantilen und juvenilen Patienten zeigt sich keine Signifikanz ($p=0,126$), dies kann ebenfalls durch die niedrige Fallanzahl vor allem in der juvenilen Gruppe mit hohem Standardfehler ($SEM=\pm 0,5900$; $n=3$) erklärt werden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass diese Analysemethode gut geeignet ist, um die pathologischen Veränderungen infantiler und juveniler M. Pompe Patienten zu klassifizieren.

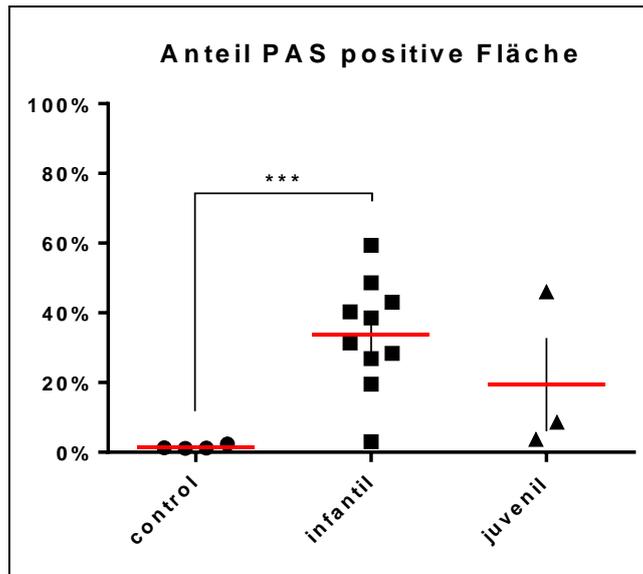


Abbildung 31: Anteil der PAS positiven Fläche (Glykogenablagerung) der Muskelbiopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Pompe mit infantiler und juveniler Verlaufsform mit Mittelwert, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)

Der Anteil der PAS Positivität (siehe Abbildung 31) der Kontrollgruppe ist hoch signifikant niedriger als der PAS positive Anteil der infantilen Patienten ($p=0,0009$). Zwischen der Kontrollgruppe und den juvenilen Patienten ($p=0,085$) und zwischen infantilen und juvenilen Patienten zeigt sich keine Signifikanz ($p=0,116$), das kann wiederum durch die niedrige Fallanzahl vor allem in der juvenilen Gruppe mit hohem Standardfehler ($SEM=\pm 13,36$; $n=3$) erklärt werden.

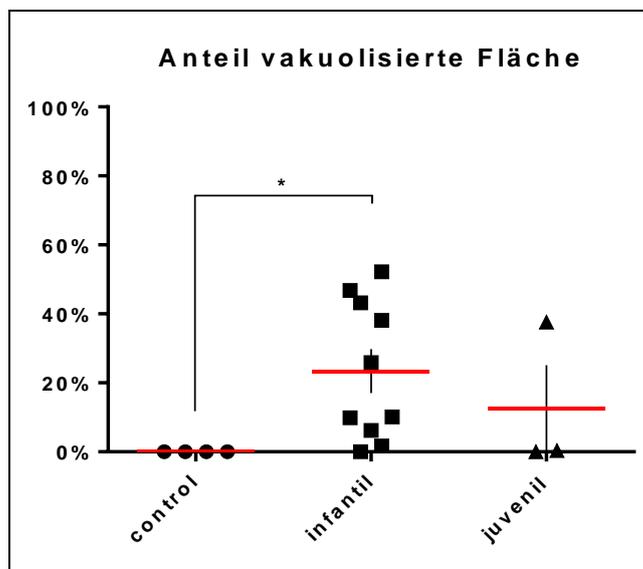


Abbildung 32: Anteil der Vakuolen in Muskelbiopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Pompe mit infantiler und juveniler Verlaufsform mit Mittelwert, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)

Der Anteils der Vakuolen (siehe Abbildung 32) der Kontrollgruppe ist signifikant niedriger als der Anteil der Vakuolen der infantilen Patienten ($p=0,021$). Zwischen der Kontrollgruppe und

den juvenilen Patienten ($p=0,139$) und zwischen infantilen und juvenilen Patienten zeigt sich keine Signifikanz ($p=0,221$). Dies kann durch die niedrige Fallanzahl vor allem in der juvenilen Gruppe mit hohem Standardfehler ($SEM=\pm 12,47$; $n=3$) erklärt werden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass diese Analysemethode gut geeignet ist, um die Glykogenablagerungen und leeren Vakuolen infantiler und juveniler M. Pompe Patienten zu klassifizieren.

4.6 Morphologische Veränderungen der Biopsien vor ERT in Abhängigkeit vom klinischen Ansprechen (Response)

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Auswertung der vor ERT entnommenen Muskelbiopsien mit dem klinischen Ansprechen der Kinder auf die ERT verglichen.

Die folgende Tabelle (Tabelle 18) zeigt alle untersuchten erkrankten Fälle geordnet nach ihrer Response, Alter des Kindes bei Biopsie und bei Beginn der ERT sowie der morphologischen Veränderungen der initialen Biopsien.

	Patient	Biopsie	Form	Alter bei ERT-Beginn (Monate)	Alter bei Biopsie (Monate)	Res.	Initialer Mo-Index G	Initialer Mo-Index high	PAS positive Fläche in %	PAS pos. + Vakuolen in %	Vakuolen in %
	Pat. 2	Biopsie 1	inf	10	1,5	1	2,05	0,10	48,65	50,35	1,66
	Pat.10*		inf	2 *	24	1					
	Pat.12	Biopsie 1	juv	50	49	1	0,51	0,02	3,72	4,08	0,36
	Pat.13		juv	4	4	1	1,04	0,00	8,63	8,63	0,00
n=3											
	MW						1,20	0,04	20,33	21,02	0,67
	SD						±0,78	±0,05	±24,65	±25,50	±0,87
	SEM						±0,452	±0,031	±14,229	±14,724	±0,504
	Pat. 1	Biopsie 1	inf	4	2	2	2,16	0,48	59,44	65,67	6,22
	Pat. 3	Biopsie 1	inf	5	2	2	1,38	0,7	19,52	29,62	10,15
	Pat.6		inf	22,5	19	2	3,14	2,44	38,47	64,37	25,86
	Pat.7		inf	4,5	4,5	2	3,49	2,65	31,37	69,47	38,05
	Pat.11	Biopsie 1	juv	108	82	3	3,04	1,78	46,02	83,61	37,59
n=5											
	MW						2,64	1,61	38,96	62,55	23,57
	SD						±0,86	±0,99	±15,04	±19,93	±14,94
	SEM						±0,384	±0,442	±6,727	±8,913	±6,681
	Pat.4*		inf	2,5 *	10	3					
	Pat.5		inf	5	4,5	3	1,72	0,64	26,88	36,78	9,88
	Pat.8*		inf	4 *	26	3					
	Pat.9		inf	10	9	3	3,74	3,03	43,05	86,25	43,23
n=2											
	MW						2,73	1,84	34,97	61,52	26,56
	SD						±1,43	±1,69	±11,43	±34,98	±23,58
	SEM						±1,010	±1,195	±8,085	±24,735	±16,675

Tabelle 18: Übersicht über die untersuchten Patienten mit Ergebnissen der morphologischen Auswertung der initialen Biopsien und des klinischen Response auf die ERT mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SEM) ohne die * Patienten (initial unter ERT entnommenen Biopsien)

Die klinische Response wird in gute, normale Entwicklung (R1), mäßige Entwicklung bzw. Verbesserung zu Vorher (R2) oder keine Verbesserung bzw. schlechte Entwicklung (R3) eingeteilt.

Die folgenden Diagramme (Abbildung 33 bis Abbildung 36) zeigen die untersuchten Fälle geordnet in drei Gruppen nach ihrem Response (R1-R3).

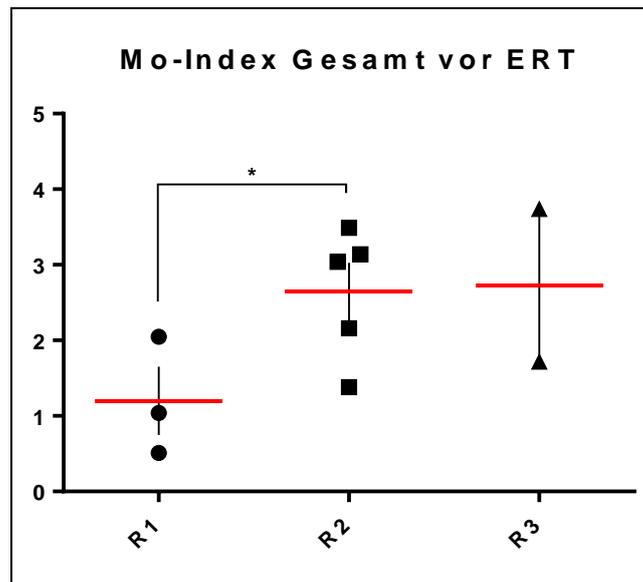


Abbildung 33: Morphologische Veränderungen in vor Beginn der ERT entnommenen Biopsien (Mo-Index Gesamt) und klinisches Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, SEM (Standardfehler) und Signifikanz (*)

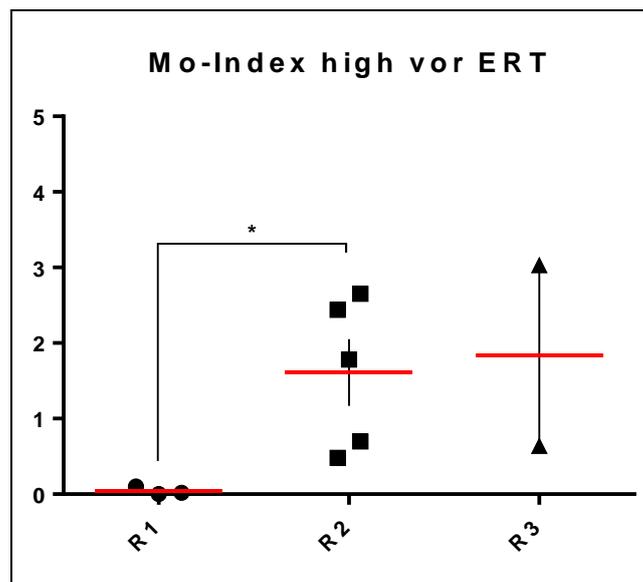


Abbildung 34: Morphologische Veränderungen in vor Beginn der ERT entnommenen Biopsien (Mo-Index high) und klinisches Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, SEM (Standardfehler) und Signifikanz (*)

Die Mo-Indizes der Gruppe mit gutem klinischen Ansprechen auf die ERT (R1) (MW Mo-Index Gesamt: 1,20; MW Mo-Index high: 0,04) sind signifikant niedriger als die Mo-Indizes der Gruppe R2 (MW Mo-Index Gesamt: 2,64; MW Mo-Index high: 1,61) ($p=0,028$ (Mo-Index Gesamt) und $p=0,019$ (Mo-Index high)). Somit zeigen sich höhere Mo-Indizes in der Gruppe mit dem schlechteren klinischen Ansprechen (R2). Im Gegensatz dazu fanden sich im Vergleich der Respondergruppen R2 und R3 sowie R1 und R3 keine signifikanten

Unterschiede. In der Gruppe R3 zeigt sich der höchste Mo-Index Gesamt, welcher mit einer besonders schweren Muskelpathologie im histologischen Bild korreliert. Allerdings gibt es in dieser Gruppe einen Ausreißer. Von diesem war bei der Auswertung nur eine Pyramide vorhanden. Da die Muskelbiopsien sehr heterogen sein können, kann es sein, dass die Analyse dieses Falls nicht aussagekräftig genug ist. Zudem ist die Gruppe R3 mit n=2 sehr klein und mit einem hohem Standardfehler (SEM) (Abbildung 33 und Abbildung 34).

Die Mo-Indizes high der Gruppe R1 liegen bei allen initialen Biopsien zwischen 0,00 und 0,10. Diese niedrigen Werte passen zu einem guten Response.

Bei einem Fall (Pat. 2) mit R1 besteht ein initialer Mo-Index Gesamt von 2,05. Dieser hohe initiale Wert würde eher einen schlechten Response erwarten lassen. Hier ergibt sich die Frage, ob die klinische Einschätzung richtig war. In der Gruppe R2 zeigen sich initiale Mo-Indizes Gesamt von 1,38 bis 3,04 und initiale Mo-Indizes high von 0,48 bis 1,78. Diese mittelhohen Werte passen zu einem mittleren Response (R2).

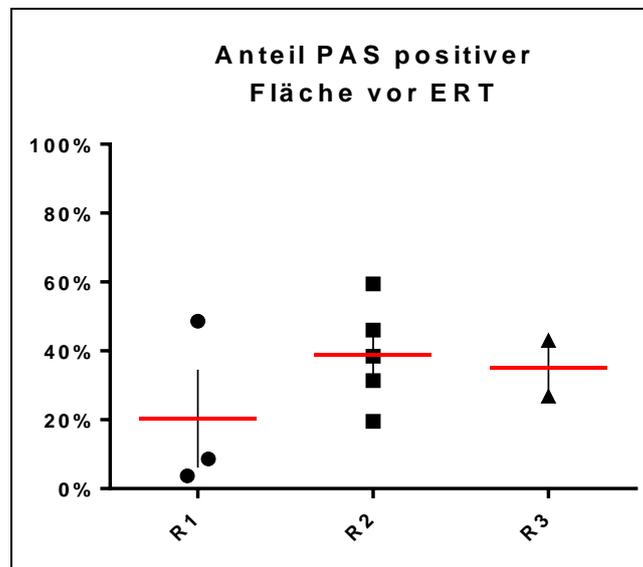


Abbildung 35: Anteil der PAS positiven Fläche in vor Beginn der ERT entnommenen Biopsien bezogen auf das klinische Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, SEM (Standardfehler) und Signifikanz (*)

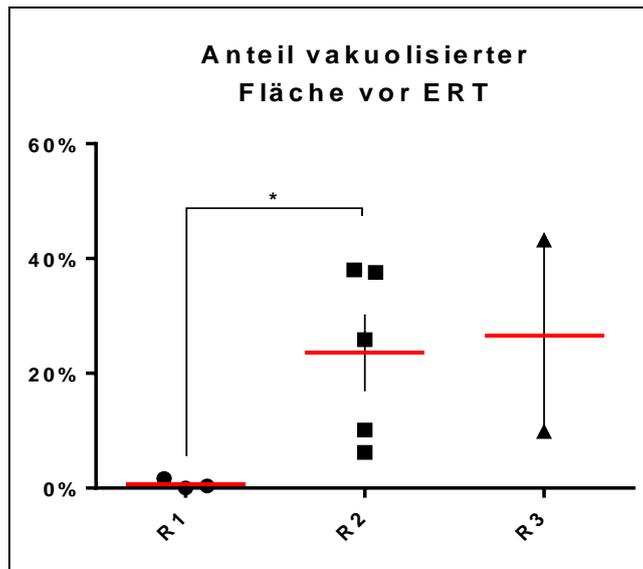


Abbildung 36: Anteil der vakuolisierten Fläche in vor Beginn der ERT entnommenen Biopsien bezogen auf das klinische Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, SEM (Standardfehler) und Signifikanz (*)

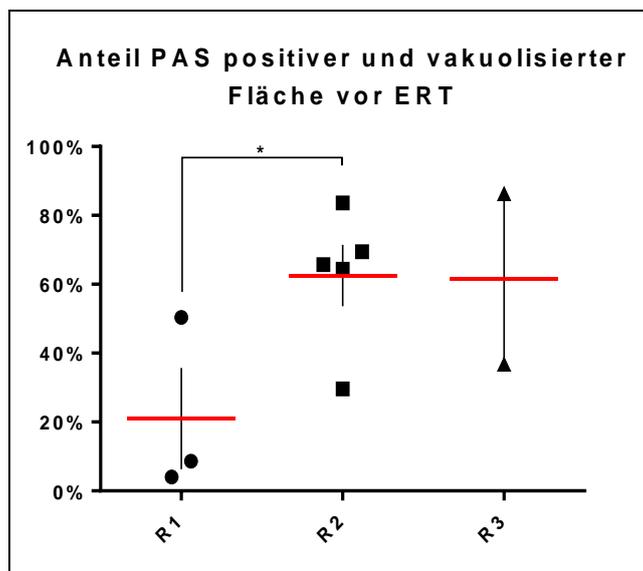


Abbildung 37: Anteil der PAS positiven und vakuolisierten Fläche in vor Beginn der ERT entnommenen Biopsien bezogen auf das klinische Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, SEM (Standardfehler) und Signifikanz (*)

Die Analyse der PAS positiven Anteile (Abbildung 35) der Gruppe R1 zeigt kein signifikant niedrigeres Ergebnis als das der Gruppen R2 und R3, jedoch zeigt sich hier ein Trend mit höheren Werten in Gruppe R2. Interessanterweise zeigen sich geringere PAS positive Ablagerungen in der Gruppe R3. Möglicherweise ist das dadurch zu erklären, dass stark veränderte Muskelfasern (Stadium 4 und 5) nur noch wenig Glykogen aufweisen, da die Struktur der Muskelfasern zerstört ist und das Glykogen ausgetreten ist. Deswegen wurde der Vergleich der vakuolisierten Bereiche (Abbildung 36) mit dem klinischen Ansprechen durchgeführt. Hier zeigt sich ein signifikant niedrigerer Anteil der vakuolisierten Fläche der

Gruppe R1 als der vakuolisierte Anteil der Gruppe R2 ($p=0,0212$). Die Kinder der Gruppe R1 haben einen sehr niedrigen Anteil an Vakuolen. Die Gruppe R2 zeigen Vakuolenanteile im mittleren Bereich und die dritte Gruppe R3 zeigt, bis auf den bekannten Ausreißer, einen noch höheren Anteil an Vakuolen. Die Mittelwerte zeigen einen deutlichen Trend: je höher der Anteil der Vakuolen, desto höhergradiger ist die Response eingeteilt, also desto schlechter ist das klinische Ansprechen.

Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich im Vergleich der PAS positiven und vakuolisierten Anteile (Abbildung 37) bezogen auf die Response. Auch hier findet sich ein signifikant niedrigerer Wert der Gruppe R1 als der der Gruppe R2 ($p=0,0206$).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Kinder mit einem guten klinischen Ansprechen auf die ERT (R1) geringere morphologische Veränderungen in der Muskelbiopsie (Mo-Index Gesamt) vor Beginn der ERT haben als Kinder mit einem mäßigen Ansprechen (R2) oder einem schlechten Ansprechen (R3).

Die Ergebnisse werden noch deutlicher bei Bestimmung des Mo-Index high, bei diesem kommen nur die hochpathologischen Veränderungen (Stadium 4 und 5) zur Darstellung.

Auch im Vergleich der Responsegruppen R1 und R2 bezogen auf den Anteil der vakuolisierten Anteile sowie der PAS positiven plus der vakuolisierten Anteile ergeben sich signifikante Unterschiede. Zusammenfassend kann also neben dem Mo-Index auch die prozentuale Auswertung der vakuolisierten Fläche, sowie der PAS positiven Fläche plus vakuolisierten Fläche Hinweise auf das Therapieansprechen liefern.

Die Auswertung der PAS positiven Fläche allein ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, insbesondere zeigten die Muskelbiopsien von Kindern mit einem schlechten Response (R3) eher niedrige Glykogenablagerungen.

Die Daten unterstützen daher die zweite Hypothese, dass die Mo-Indizes der initialen Biopsie vor ERT hinweisend auf den Erfolg bzw. das Ansprechen der ERT sind und so als prädiktive Marker gewertet werden können.

Die Analyse der PAS positiven Fläche allein ist dagegen weniger aussagekräftig als die Analyse der leeren Vakuolen.

4.7 Morphologische Veränderungen der Muskelbiopsien unter ERT in Abhängigkeit vom klinischen Ansprechen (Response)

Die folgende Tabelle (Tabelle 19) zeigt alle untersuchten erkrankten Fälle geordnet nach ihrer Response, Alter des Kindes bei Biopsie und bei Beginn der ERT sowie der morphologischen Veränderungen unter ERT.

	Patient	Biopsie	Verlauf s-form	Alter bei ERT-Beginn (Monate)	Alter bei Biopsie (Monate)	Res.	Mo-Index Gesamt	Mo-Index high	PAS pos. in %	PAS pos. + Vak. in %	Vakuolen in %
	Pat.2	Biopsie 2	inf	10	47	1	0,47	0,30	2,66	8,22	5,56
	Pat.10		inf	2	24	1	0,15	0,00	3,05	3,05	0,00
	Pat.12	Biopsie 3	juv	50	73	1	0,48	0,00	16,11	16,11	0,00
n=3											
MW							0,37	0,10	7,27	9,13	1,85
SD							±0,19	±0,17	±7,66	±6,58	±3,21
SEM							±0,108	±0,100	±4,420	±3,797	±1,853
	Pat. 1	Biopsie 2	inf	4	34	2	3,27	1,15	63,78	82,08	18,3
	Pat. 3	Biopsie 2	inf	5	38	2	3,38	1,93	48,64	89,66	41,02
	Pat.11	Biopsie 2	juv	108	136	2	3,26	2,22	44,53	67,88	23,35
n=3											
MW							3,30	1,77	52,32	79,87	27,56
SD							±0,07	±0,55	±10,14	±11,06	±11,93
SEM							±0,038	±0,319	±5,853	±6,383	±6,888
	Pat.8		inf	4	26	3	3,51	3,01	28,37	75,17	46,75
	Pat.4		inf	2,5	10	3	4,08	3,6	40,32	92,52	52,22
n=2											
MW							3,80	3,31	34,35	83,85	49,49
SD							±0,40	±0,42	±8,45	±12,27	±3,87
SEM							±0,285	±0,295	±5,975	±8,675	±2,735

Tabelle 19: Übersicht über die untersuchten Patienten mit Ergebnissen der morphologischen Auswertung unter ERT und des Response mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SEM)

Die folgenden Abbildungen (Abbildung 38 bis Abbildung 42) stellen den Zusammenhang zwischen dem Response und der morphologischen Veränderungen der Biopsien unter ERT dar.

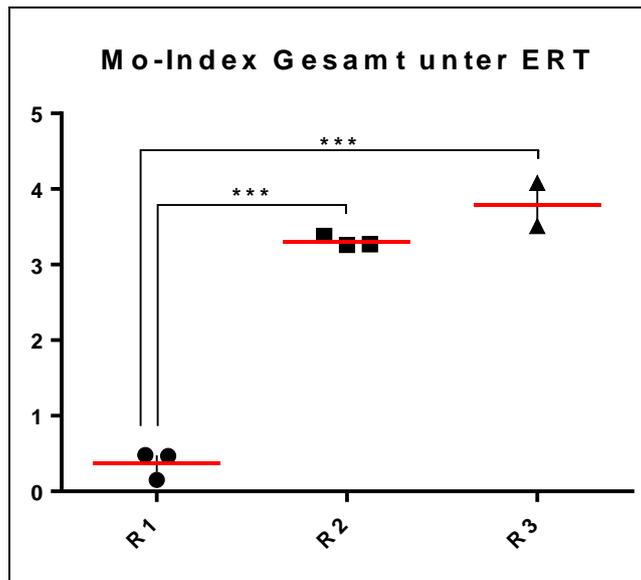


Abbildung 38: Morphologische Veränderungen in unter ERT entnommenen Biopsien (Mo-Index Gesamt) und klinisches Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)

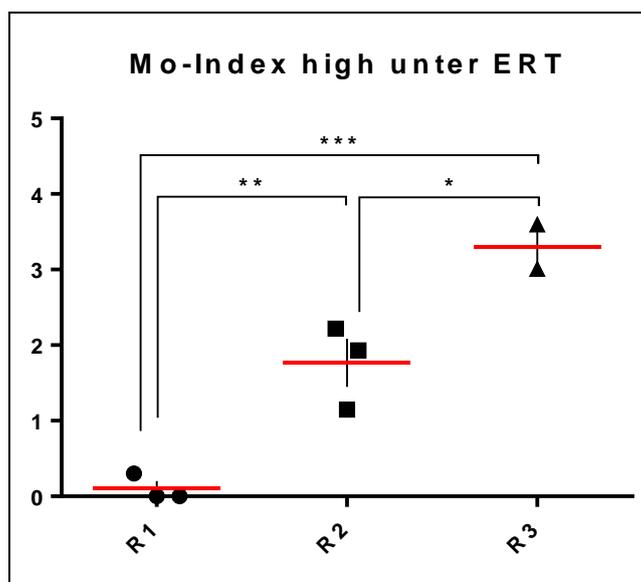


Abbildung 39: Morphologische Veränderungen in unter ERT entnommenen Biopsien (Mo-Index high) und klinisches Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)

Die Abbildung 38 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen dem Mo-Index Gesamt unter ERT und dem Response der Patienten. Der Mo-Index Gesamt der Gruppe R1 ist hoch signifikant niedriger als der Mo-Index Gesamt der Gruppe R2 ($p < 0,0001$) und R3 ($p = 0,0004$). Die Patienten mit gutem klinischen Ansprechen (R1) haben einen niedrigen Mo-Index Gesamt, die Patienten mit R2 einen höheren und die Patienten mit R3 den höchsten Mo-Index Gesamt.

Dieser Zusammenhang zeigt sich auch zwischen Mo-Index high unter ERT und Response (Abbildung 39). Auch hier ist der Mo-Index high der Gruppe R1 sehr signifikant niedriger als

der Mo-Index high der Gruppe R2 ($p=0,0038$), sowie hoch signifikant niedriger als der Mo-Index high der Gruppe R3 ($p=0,0005$). Außerdem ist der Mo-Index high der Gruppe R2 signifikant niedriger als der der Gruppe R3 ($p=0,0230$). Je höher der Mo-Index high, desto niedriger ist das klinische Ansprechen (R3) und umgekehrt.

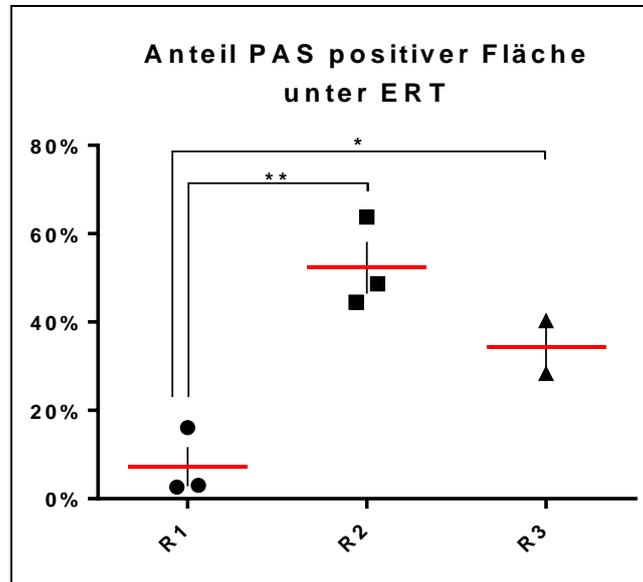


Abbildung 40: Anteil PAS positiver Fläche in unter ERT entnommenen Biopsien bezogen auf das klinische Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)

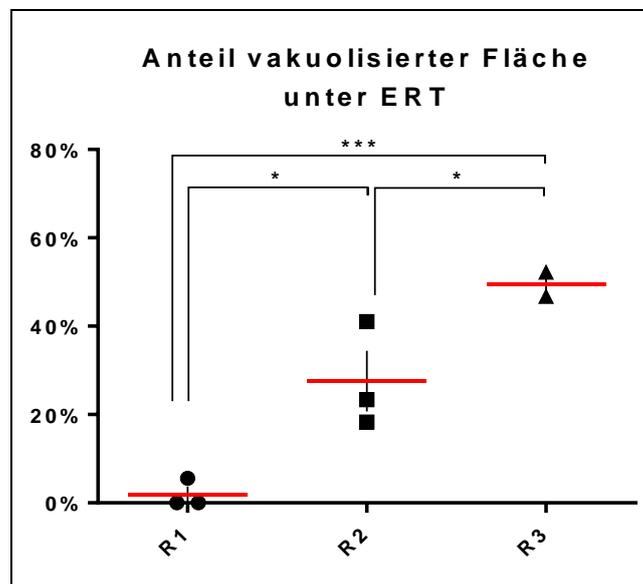


Abbildung 41: Anteil vakuolisierter Fläche in unter ERT entnommenen Biopsien bezogen auf das klinische Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)

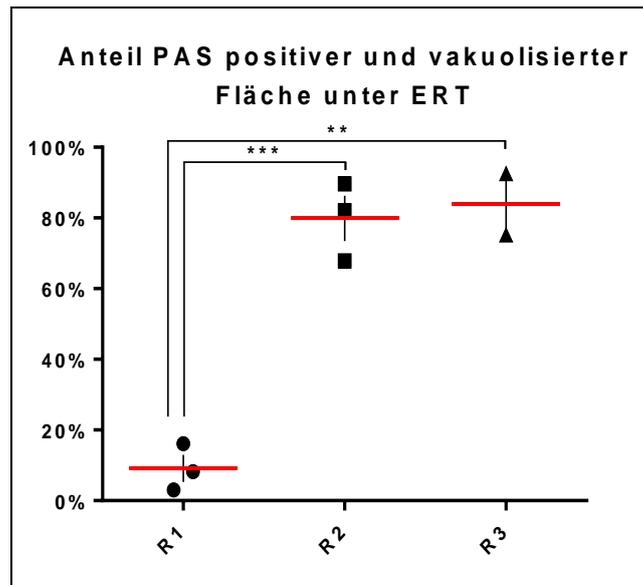


Abbildung 42: Anteil PAS positiver und vakuolisierter Fläche in unter ERT entnommenen Biopsien bezogen auf das klinische Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)

Der Anteil der PAS positiven Fläche der Gruppe R1 ist sehr signifikant niedriger als der der Gruppe R2 ($p=0,0018$) und signifikant niedriger als der der Gruppe R3 ($p=0,0167$). Der Anteil der PAS positiven Fläche ist in der Gruppe R3 ist allerdings niedriger als in der Gruppe R2 (Abbildung 40).

Des Weiteren wurde der Anteil der Vakuolen mit dem Response verglichen. Hier zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Zusammenhang (Abbildung 41): Der Anteil der vakuolisierten Fläche der Gruppe R1 war signifikant niedriger als der der Gruppe R2 ($p=0,0113$) und hoch signifikant niedriger als der der Gruppe R3 ($p=0,0003$). Der Anteil der vakuolisierten Fläche der Gruppe R2 war ebenfalls signifikant niedriger als der der Gruppe R3 ($p=0,0478$).

Auch bezogen auf den Anteil an PAS positiver und vakuolisierter Fläche fanden sich sehr signifikante und hoch signifikante Ergebnisse: Der Anteil an PAS positiver und vakuolisierter Fläche der Gruppe R1 ist hoch signifikant niedriger als der der Gruppe R2 ($p=0,0003$) und sehr signifikant niedriger als der der Gruppe R3 ($p=0,0014$) (siehe Abbildung 42).

Die **Zusammenschau** der Ergebnisse zeigt, dass die erste aufgestellte Hypothese bestätigt werden kann. Die Ergebnisse darauf hin, dass Kinder mit einem guten klinischen Ansprechen auf die ERT (R1) geringere morphologische Veränderungen in der Muskelbiopsie unter ERT (Mo Index) haben als Kinder mit einem mäßigen Ansprechen (R2) oder einem schlechten Ansprechen (R3). Jeder der vorgestellten Fälle zeigt entsprechend seiner Response eine passende Morphologie in der untersuchten Muskelbiopsie unter ERT. Je besser der Response, desto niedriger sind die Mo-Indizes der Biopsien und je schlechter

der Response, desto höher sind die Mo-Indizes. Wie in Tabelle 19 ersichtlich liegt der Mo-Index Gesamt der Gruppe R1 immer unter 0,50, der Mo-Index high liegt maximal bei 0,30.

Je schlechter der Response desto höher sind die analysierten Mo-Indizes der Muskelbiopsie. Zum Beispiel liegt der Mo-Index Gesamt in der Gruppe R2 bei über 3,00 und der Mo-Index high zwischen 1,15 und 2,22. In der letzten Gruppe R3 liegt der Mo-Index Gesamt zwischen 3,51 und 4,08, der Mo-Index high bei 3,01 bis 3,60.

Der Anteil der positiven Fläche korreliert in den Muskelbiopsien, welche unter Therapie entnommen wurden, besser mit dem Response der Gruppe R1 und R2 als in den Biopsien, die vor Beginn der ERT entnommen wurde. Allerdings zeigt sich auch hier, dass Kinder mit einem schlechten Response (R3) mit starken pathologischen Veränderungen eher geringe Glykogenablagerungen aufweisen, so dass die Betrachtung der PAS positiven Fläche alleine weniger gut geeignet zum Beurteilen des Therapieansprechens ist.

4.8 Morphologische Veränderungen der 5 Rebiopsien unter ERT

Um die individuelle Veränderung der Skelettmuskulatur unter ERT zu beurteilen, wurden die Ergebnisse der 5 Rebiopsien mit denen der ersten Biopsie (vor Beginn der ERT) verglichen. Das heißt in diesem Abschnitt wurden nur die Biopsien der 5 Patienten betrachtet, die sowohl vor als auch unter der ERT eine Muskelbiopsie erhalten haben.

Die folgende Tabelle 20 zeigt alle untersuchten Rebiopsien bezüglich des Zuwachses der Stadien 4 und 5, der PAS Positivität, der PAS Positivität + Vakuolen, des Mo-Index Gesamt und des Mo-Index high geordnet nach der Response im Vergleich zur ersten Biopsie.

Patient	Biopsie	inf. /juv.	Response	Veränd. Stad. 4, 5	Veränd. PAS pos.	Veränd. Vak	Veränd. PAS pos. + Vak	Veränd. Mo-Index Gesamt	Veränd. Mo-Index high
Pat. 2	Biopsie 1 Biopsie 2	inf	1	+4,3%	-46,0%	+3,90%	-42,1%	-1,58	+0,20
Pat.12	Biopsie 1 Biopsie 2 Biopsie 3	juv	1	-0,2%	+12,36%	-0,36%	+12,0%	-0,03	-0,02
Pat. 1	Biopsie 1 Biopsie 2	inf	2	+13,4%	+4,3%	+12,08%	+16,38%	+1,11	+0,67
Pat. 3	Biopsie 1 Biopsie 2	inf	2	+28,7%	+29,1%	+30,9%	+60,0%	+2,00	+1,23
Pat.11	Biopsie 1 Biopsie 2	juv	2	+12,8%	-1,5%	-14,3%	-15,7%	+0,22	+0,44

Tabelle 20: Morphologische Veränderungen der Rebiopsien unter ERT (Stadien 4 und 5, PAS Positivität, Vakuolen, PAS Positivität plus Vakuolen, Mo-Index Gesamt und Mo-Index high)

In der morphologische Analyse der Biopsien (siehe Tabelle 20) zeigt sich bei Patient 2 mit einem guten Response (R1) ein deutlicher Rückgang der PAS positiven Anteile (Glykogenclearance) von -46%. Es zeigt sich nur ein geringer Anstieg der leeren Vakuolen (+3,9%). Dieser Patient zeigt ein gutes Therapieansprechen (R1) und an den Werten erkennbar eine gute Glykogenclearance. Die stark geschädigten Muskelfasern (Stadium 4 und 5) nehmen jedoch geringgradig zu.

Bei Patient 12 mit R1 findet sich dagegen eine Zunahme der PAS-Positivität von 12,4% und damit eine schlechte Glykogenclearance. Allerdings zeigt sich eine Abnahme der Vakuolen und der Mo-Indizes. Dieser Patient zeigt ebenfalls ein gutes Ansprechen auf die ERT.

Die Patienten 1 und 3, beide ebenfalls R2, zeigen dagegen eine Zunahme aller Werte, insbesondere der PAS-Positivität und der Vakuolen und somit auch einen deutlichen Anstieg der Mo-Indizes. Hier wird das schlechtere Therapieansprechen durch die Zunahme der pathologischen Muskelveränderungen bestätigt.

Patient 11, mit mittlerem Ansprechen auf die ERT (R2), zeigt eine geringe Glykogenclearance mit Abnahme der PAS Positivität von 1,5% und eine geringe Zunahme der Mo-Indizes.

Zusammenfassend unterstützen die vorliegenden Daten die Hypothese, dass die alleinige Auswertung des PAS positiven Anteils (Glykogenclearance) nicht ausreichend ist, um den Erfolg der Therapie zu beurteilen. Stattdessen sollten die gesamten morphologischen Veränderungen der Muskulatur beurteilt werden, hierbei haben insbesondere die hochpathologischen Veränderungen (Stadien 4,5, Mo-Index high und der Anteil der leeren Vakuolen) eine große Bedeutung.

4.9 Korrelation der Mo-Indizes der initialen Biopsien mit verschiedenen klinischen Parametern

Die Ergebnisse der Analyse der Muskelbiopsien sollen mit verschiedenen klinischen Werten und Laborparametern korreliert werden. Es werden verschiedene Parameter zur Beurteilung der kardialen Funktion (BNP, LVPW, SF), die Enzymaktivität in den Fibroblasten (GAA) und ein Marker zur Beurteilung der Schädigung der Skelettmuskulatur (CK) untersucht (Tabelle 21).

	Patient	Biopsie	Form	Motorik	Response	BNP-Viel-fache	LVPW in mm	SF in %	GAA in mU/mg	CK Vielfache vor ERT	Mutation	initialer Mo-Index Gesamt	initialer Mo-Index high	PAS positive Fläche in %	PAS pos. + Vakuolen in %	Vak. in %
	Pat. 2	Biopsie 1	inf	3	1	2	5	44	0,52	3,5	c.1933 G>A	2,05	0,10	48,65	50,35	1,66
	Pat.10*		inf	3	1	0,8	6	52	0,01	2,8	c.1157insA	0,15	0,00	3,05	3,05	0,00
	Pat.12	Biopsie 1	juv	3	1	0,4	7	48		1,2	IVS0-45T>G; IVS16+102_IVS 17+31 del	0,51	0,02	3,72	4,08	0,36
	Pat.13		juv	3	1	0,5	6	45		1,1	IVS0-45T>G; IVS16+102_IVS 17+31 del	1,04	0,00	8,63	8,63	0,00
n=4																
MW						0,93	6	47	0,27	2,2		1,20	0,03	16,01	16,53	0,51
SD						±0,74	±0,82	±3,59	±0,36	±1,19		±0,78	±0,05	±21,90	±22,68	±0,79
SEM						±0,368	±0,408	±1,797	±0,180	±0,595		±0,391	±0,024	±10,950	±11,339	±0,394
	Pat. 1	Biopsie 1	inf	2	2	2,5	6	15	0,23	2,9	c.266 C>A; c.104 T>C	2,16	0,48	59,44	65,67	6,22
	Pat. 3	Biopsie 1	inf	2	2	0,5	5	34	0,37	3,1	c.1859 G>A; Del Exon 18	1,38	0,7	19,52	29,62	10,15
	Pat.6		inf	2	2	4,1	9	28	0,41	6,6	c.524.del TG; c.1655 T>C (L552P)	3,14	2,44	38,47	64,37	25,86

	Patient	Biopsie	Form	Motorik	Response	BNP-Viel-fache	LVPW in mm	SF in %	GAA in mU/mg	CK Vielfache vor ERT	Mutation	initialer Mo-Index Gesamt	initialer Mo-Index high	PAS positive Fläche in %	PAS pos. + Vakuolen in %	Vak. in %
	Pat.7		inf	2	2	3,2	9	34	0,19	2,6	c.2078insA	3,49	2,65	31,37	69,47	38,05
	Pat.11	Biopsie 1	juv	2	2	0,8	6	51		2,2	c.2799ins466bp c.IVS18-3C>G	3,04	1,78	46,02	83,61	37,59
n=5																
MW						2,22	7	32,4	0,3	3,48		2,64	1,61	38,96	62,55	23,57
SD						±1,54	±1,87	±12,97	±0,11	±1,78		±0,86	±0,99	±15,04	±19,93	±14,94
SEM						±0,691	±0,837	±5,802	±0,048	±0,795		±0,384	±0,442	±6,727	±8,913	±6,681
	Pat.4*		inf	1	3	5,3	8	36	0,22	4,6	c.2213G>A (W738X); Exon 16 del536bp	4,08	3,6	40,32	92,52	52,22
	Pat.5		inf	1	3	4,6	7	26	0,23	2,7	c.1456G>C	1,72	0,64	26,88	36,78	9,88
	Pat.8*		inf	1	3	0,5	4	39	0,17		c.2662 G>T	3,51	3,01	28,37	75,17	46,75
	Pat.9		inf	2	3	0,9	11	22	0,09	4,3	c.2431insC	3,75	3,03	43,05	86,25	43,23
n=4																
MW						2,83	7,50	30,75	0,18	3,87		2,74	2,57	34,66	72,68	38,02
SD						±2,48	±2,89	±8,06	±0,06	±1,02		±1,44	±1,32	±8,22	±24,99	±19,12
SEM						±1,238	±1,443	±4,029	±0,032	±0,511		±0,718	±0,658	±4,108	±12,493	±9,561

Tabelle 21: Übersicht der untersuchten Fälle der Patienten mit M. Pompe mit Mo-Index Gesamt, Mo-Index high und verschiedene klinischen Parametern

Motorik (1=liegen, 2=sitzen, 3=laufen), brain natriuretic peptide-Vielfachen (BNP), left ventricular posterior wall (LVPW), shortening fraction (SF), GAA-Enzymaktivität in den Fibroblasten, Creatinkinase-Vielfachen (CK) und Response. Bei den Fällen mit * wurden die initialen Biopsien erst unter ERT entnommen.

Die folgenden Diagramme (Abbildung 43 bis Abbildung 47) zeigen eine lineare Regressionsanalyse der initialen Mo-Indizes mit verschiedenen Laborparametern. Es wurde die Signifikanz (p-Wert) sowie der Determinationskoeffizient (R^2) mit dem Programm GraphPad Prism 5 berechnet.

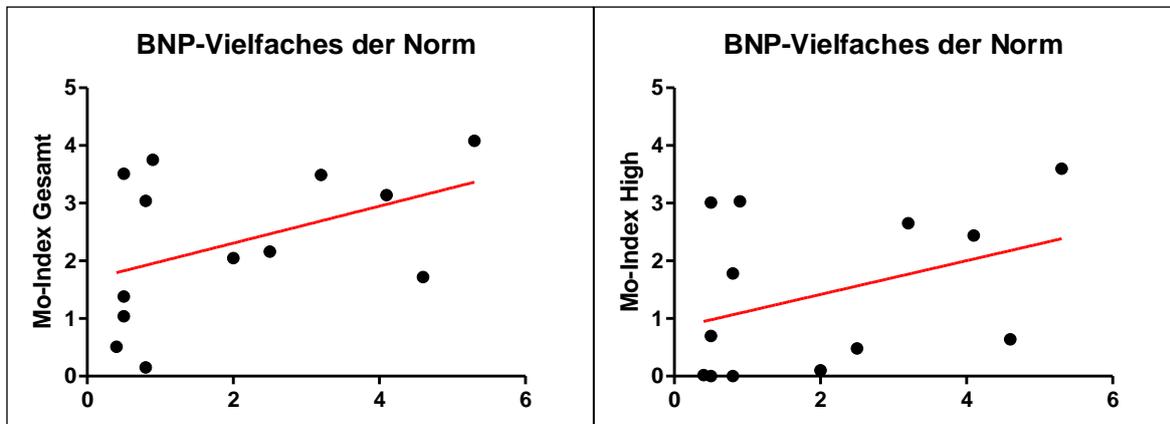


Abbildung 43: Korrelation der initialen Mo-Indizes mit dem BNP-Vielfachen des altersentsprechenden Normwertes

Es fand sich keine signifikante Korrelation der Mo-Indizes mit den BNP-Vielfachen der Norm (Mo-Index Gesamt: $R^2=0,18$, $p=0,14$; Mo-Index high: $R^2=0,14$, $p=0,20$). Es zeigt sich jedoch ein Trend, dass höhere Mo-Indizes mit erhöhten BNP-Werten einhergehen und so mit einer kardialen Schädigung korrelieren (Abbildung 43).

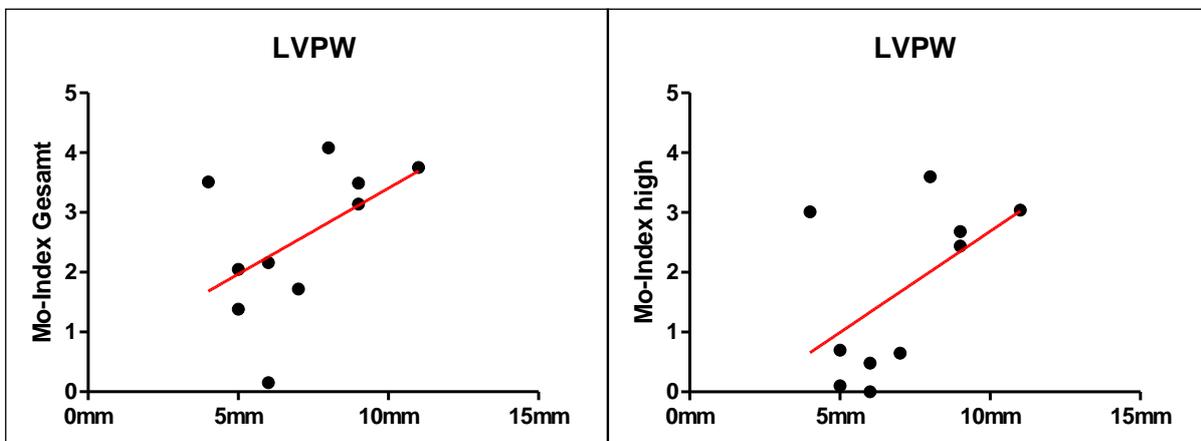


Abbildung 44: Korrelation der initialen Mo-Indizes mit dem LVPW in mm

Bei dieser Analyse konnten nur die infantilen Fälle mit einbezogen werden ($n=10$), da die juvenilen Fälle aufgrund der körperlichen Weiterentwicklung bezogen auf die LVPW nicht mit den infantilen Fällen verglichen werden können. Es fand sich keine signifikante Korrelation der Mo-Indizes mit der LVPW (Mo-Index Gesamt: $R^2=0,26$, $p=0,14$; Mo-Index high: $R^2=0,29$, $p=0,11$). Es lässt sich ein Trend erkennen, dass höhere Mo-Indizes mit erhöhten LVPW-Werten einhergehen und somit mit einer kardialen Pathologie korrelieren (Abbildung 44).

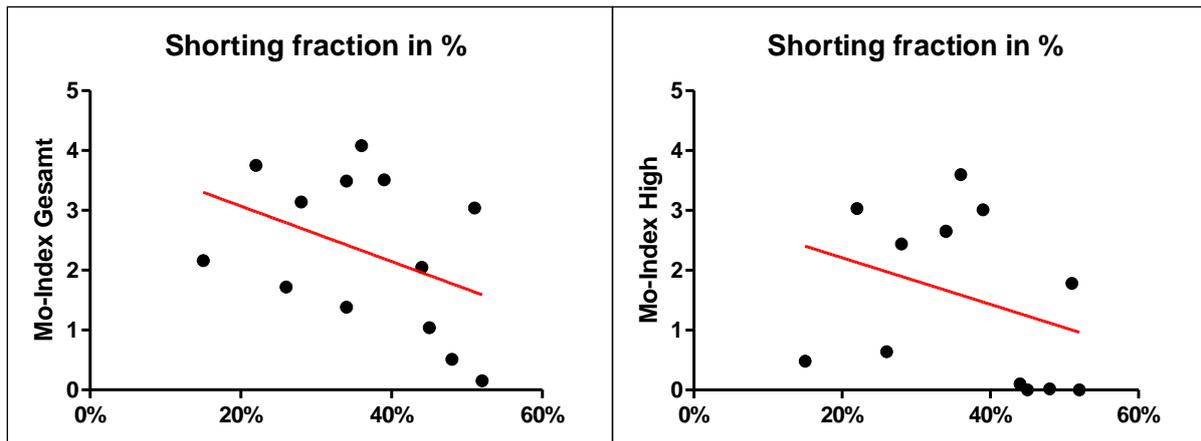


Abbildung 45: Korrelation der initialen Mo-Indizes mit der shortening fraction in %

Es zeigt sich keine signifikante Korrelation der shortening fraction mit den Mo-Indizes (Mo-Index Gesamt: $R^2=0,17$, $p=0,16$; Mo-Index high: $R^2=0,10$, $p=0,28$) (Abbildung 45). Allerdings lässt sich ein Trend erkennen, je höher die SF, desto niedriger die Mo-Indizes, also desto besser ist die kardiale Funktion.

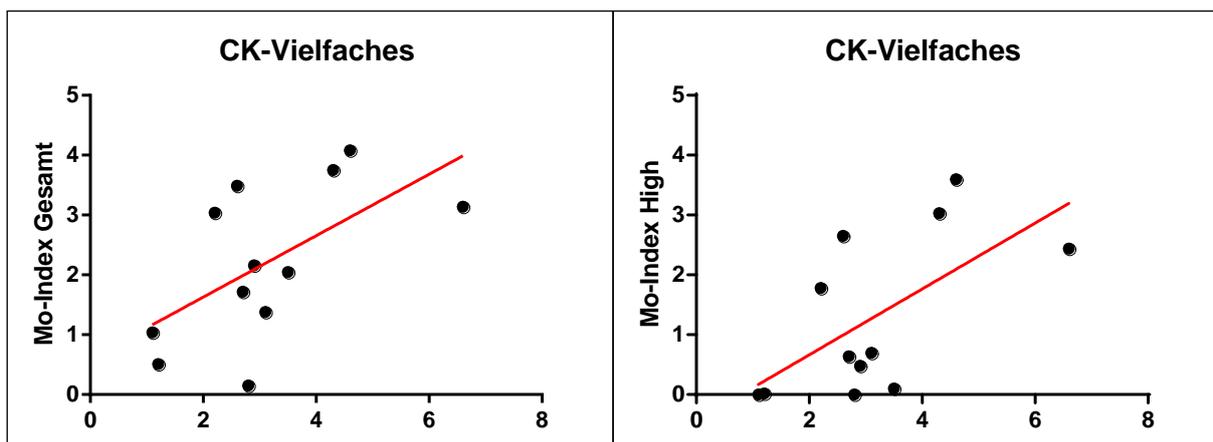


Abbildung 46: Korrelation der initialen Mo-Indizes mit dem CK-Vielfachen des altersentsprechenden Normwertes

Die CK-Vielfachen des altersentsprechenden Normwertes bezogen auf die Mo-Indizes zeigen eine signifikante Korrelation bezogen auf den Mo-Index Gesamt ($p=0,04$; $R^2=0,36$), und auf den Mo-Index high ($p=0,03$; $R^2=0,39$) (Abbildung 46). Je ausgeprägter die Muskelschädigung, desto höher die CK. Dieses Ergebnis unterstützt die Bedeutung der durchgeführten Analyseverfahren.

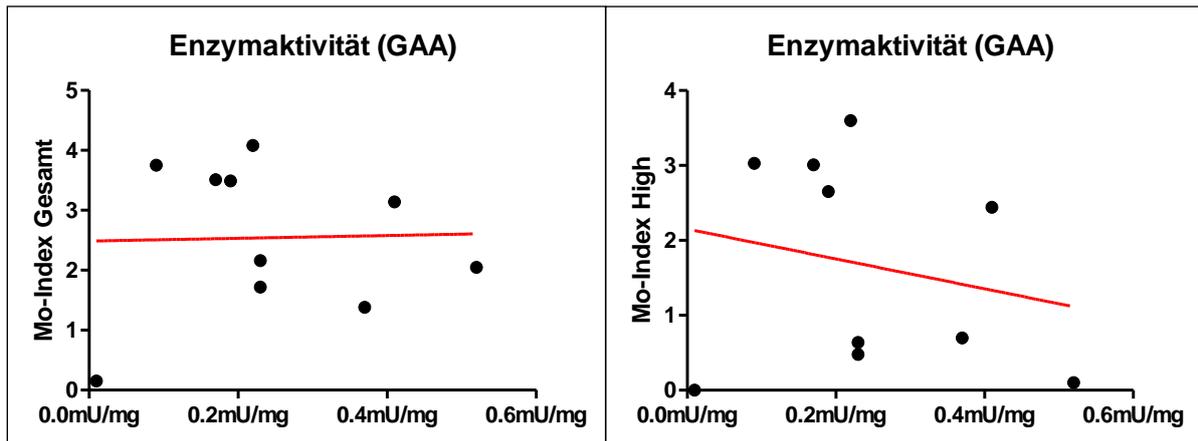


Abbildung 47: Korrelation der initialen Mo-Indizes mit der Enzymaktivität (GAA-Aktivität) in mU/mg

Im Vergleich der Enzymaktivität (GAA-Aktivität) in mU/mg bezogen auf die Mo-Indizes zeigt sich keine signifikante Korrelation (Abbildung 47) (Mo-Index Gesamt: $R^2=0,0007$, $p=0,94$; Mo-Index high: $R^2=0,05$, $p=0,55$). Allerdings zeichnet sich auch hier, zumindest bezüglich des Mo-Index high, ein Trend ab: Je niedriger die Enzymaktivität, desto höher der Mo-Index high, also desto schwerer die morphologische Veränderung.

4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine detaillierte morphologische Untersuchung der Muskelpathologie von Kindern mit Morbus Pompe etabliert werden, um die Ergebnisse der Muskelbiopsien mit dem klinischen Ansprechen auf die Enzymersatztherapie zu vergleichen. Die initiale Fragestellung war, ob man durch die pathologischen Veränderungen der Muskelbiopsie eine Aussage darüber treffen kann, ob der Betroffene möglicherweise gut oder weniger gut auf die ERT anspricht.

Zunächst wurde an unterschiedlich fixiertem Muskelgewebe eine optimierte Färbemethode zur Darstellung der Glykogenablagerungen und der pathologischen Veränderungen etabliert. Dabei zeigten sich die besten Ergebnisse an PAS gefärbten Semidünn-Schnitten von glutaraldehydfixiertem, in Kunststoff eingebettetem, Material. Diese Schnittpräparationen zeigten bessere Ergebnisse als unfixierte Kryostatschnitte oder formalinfixierte Paraffinschnitte insbesondere bei der Darstellung von geringergradigen Veränderungen. Zudem sind in Kunststoff eingebettete Muskelbiopsien lange haltbar, unkompliziert zu versenden und man kann zahlreiche Semidünnschnitte anfertigen.

Die gefärbten Schnittpräparate wurden mit drei verschiedenen Analyseverfahren untersucht. Zum einen wurden unterschiedliche Muskelfaserstadien festgelegt, welche mit und ohne eine Software-gestützte Analyse ausgewertet wurden (MA1 und MA2). Die pathologischen Veränderungen wurden dann in einem Wert dargestellt (Mo-Index). Dieser neu etablierte Mo-Index machte eine statistische Auswertung mit dem klinischen Ansprechen auf die Therapie sowie mit unterschiedlichen klinischen Parametern möglich.

In der dritten Analyse (MA3) wurde die PAS positive Fläche, welche den Glykogenablagerungen entspricht, sowie leere (PAS negative) Vakuolen mit einer Software-gestützten Analyse bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die morphologische Auswertung der Biopsien unter ERT das klinische Ansprechen der ERT (Response) anzeigt. Das heißt die Mo-Indizes der Gruppe mit einem guten klinischen Ansprechen waren signifikant niedriger im Vergleich zu Gruppen mit einem mittleren Ansprechen und einem schlechteren Ansprechen.

Diese Erkenntnis wird durch die Einzelfallbeispielen unterstützt, hier zeigt sich, dass Patienten mit einem guten klinischen Response eine gute Glykogen-clearance zeigen, sowie eine Verminderung der morphologischen Indizes. Patienten mit einem schlechteren klinischen Ansprechen zeigen unter Therapie eine schlechtere Glykogen-clearance sowie einen Anstieg der morphologischen Indizes. Patienten mit schlechtem Ansprechen auf die

ERT haben initial bereits einen hohen morphologischen Index und hohe Glykogenablagerungen.

Die Ergebnisse der morphologischen Auswertung der initialen Biopsie vor ERT sind hinweisend auf den Erfolg bzw. das Ansprechen der ERT. Es besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen den initialen Mo-Indizes und dem Response der Kinder. Es fanden sich signifikant niedrigerer Mo-Indizes der Gruppe mit einem guten Ansprechen im Vergleich zu Kindern mit einem schlechten Ansprechen.

5 Diskussion

Morbus Pompe wurde erstmals 1932 von dem niederländischen Pathologe Dr. J. C. Pompe beschrieben. Der Arzt entdeckte bei der Obduktion eines 8 Monate alten Mädchens im Lichtmikroskop eine enorme Glykogenansammlung in Herz- und Skelettmuskelzellen und hat diesen Fall daraufhin in seiner Publikation „Over idiopathische hypertrophie van het hart“ beschrieben. Die Todesursache des Kindes war eine kardiale Myopathie (Di Rocco et al., 2007; Fernandes, 1995; Pompe, 1932). Bei Morbus Pompe, oder auch Glykogenose Typ II genannt, kommt es durch einen Mangel des lysosomalen Enzyms GAA zu einer pathologischen Glykogenablagerung in den Lysosomen der Zelle und so zu einem Funktionsverlust der betroffenen Zellen. Die Glykogenose Typ II ist mit 15% die häufigste der bisher bekannten Glykogenosen. Die Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt und betrifft somit beide Geschlechter gleichermaßen. Aktuell sind über 250 verschiedenen Mutationen des GAA-Gens bekannt (Lammens et al., 2009). Häufige Mutationen der Krankheit in der kaukasischen Population sind zum Beispiel die DelT525, Del exon18 und die splice-site-Mutation IVS 1-13T>G. Besonders häufig in der asiatischen Population ist die Missense-Mutation 1935 (Asp645Glu), bei dieser Mutation wird die Base Cytosin durch Arginin ersetzt. In der afro-amerikanischen Bevölkerung ist die Nonsense-Mutation 2560 (Arg854X) häufig, hier wird die Base Cytosin durch Thymin ersetzt (Hirschorn et al., 2001; Kroos et al., 2007; „Pompe Center Erasmus MC,“ 2014). Die Inzidenz der Erkrankung variiert abhängig der jeweiligeren ethnischen Gruppe zwischen 1:40.000 und 1:300.000 und gehört daher zu den sogenannten rare diseases (Hirschorn et al., 2001; Lammens et al., 2009).

Die Hauptsymptome bei der infantilen Form bestehen aus Kardiomyopathie, Muskelschwäche und muskulärer Hypotonie („floppy infant“). Patienten mit einer late-onset Verlaufsform haben eine Muskelschwäche, insbesondere der proximalen Muskulatur wobei die Schwäche der Zwerchfellmuskulatur häufig zu einer Ateminsuffizienz führt (Kishnani et al., 2013). Unbehandelt führt die infantile Verlaufsform innerhalb der ersten Lebensjahre zum Tod durch kardiorespiratorisches Versagen, währenddessen die late-onset Formen einen sehr heterogenen Verlauf zeigen können (Fernandes, 1995; Hers, 1963; Hirschorn et al., 2001).

5.1 Enzymersatztherapie (ERT)

Seit dem Jahr 2006 ist eine Enzymersatztherapie mit rekombinanter humaner α -1,4-Glucosidase (rh-GAA, Myozyme®) verfügbar (Genzym, 2009; Kishnani et al., 2013; Ploeg et al., 2008). Dieser Enzymersatz wird mittels rekombinanter DNA-Technologie aus Kulturen der Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO) oder Kaninchenmilch gewonnen (Angelini et al., 2012; Rossi et al., 2007; van den Hout et al., 2000). Durch die Therapie ist die Überlebenswahrscheinlichkeit der Kinder mit infantiler Form deutlich verbessert (Kishnani

et al., 2007). Allerdings ist die Therapie teilweise mit starken Nebenwirkungen (z.B. allergische Reaktionen, Schmerzen, Hautreaktionen (Genzyme, 2007)) verbunden. Außerdem muss die Therapie lebenslang alle 2 Wochen intravenös in Spezialzentren verabreicht werden und ist sehr kostenintensiv. In den aktuellen Leitlinien werden pro Kg Körpergewicht jeweils 20 mg empfohlen. Die Kosten für 500 mg betragen zurzeit 6751 Euro ("Rote Liste," 2014).

Manche Kinder zeigen trotz Therapie keine signifikante Verbesserung der Symptomatik (Nicolino et al., 2009; Ploeg et al., 2008). Die Mechanismen, welche dafür verantwortlich sind, sind bisher noch nicht vollständig verstanden und man geht von einer multifaktoriellen Ursache aus. Es wird ein Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf der ERT und dem Zeitpunkt des Therapiebeginns vermutet. Die Gruppe von Frau Kishnani wertete in ihrer Studie aus dem Jahr 2013 die Ergebnisse aus der weltweiten Pompe Registry aus. In dieser Registrierung sind aktuell 1003 Patienten, welche an M. Pompe erkrankt sind, registriert. In der Datei werden die Patienten in 3 Gruppen unterteilt: Gruppe A: Onset der Erkrankung < 12 Monate mit Kardiomyopathie, Gruppe B: Onset < 12 Monate ohne Kardiomyopathie und Onset > 12 Monate bis < 12 Jahre und Gruppe C: Onset > 12 Jahre. Die Gruppe A hat die kürzeste Spanne zwischen Symptombeginn und Diagnosestellung (1,4 Monate). Gruppe B und C liegen mit einer Spanne von 12,6 Jahren und 6,0 Jahren deutlich darüber. In der Auswertung der Daten zeigt sich, dass die Kinder, welche später diagnostiziert und somit später mit der ERT beginnen, ein schlechteres Therapieansprechen zeigen als die Kinder die früh mit der ERT beginnen (Kishnani et al., 2013). In einer Studie von Winkel et al. aus dem Jahr 2003 wurden 4 infantile Kinder untersucht, auch hier zeigte sich ein besseres Outcome bei frühzeitigem Therapiebeginn bzw. eine Korrelation zwischen Therapieansprechen und bereits bestehender Schädigung des Muskelgewebes bei Therapiebeginn (Winkel et al., 2003) ähnlich der Ergebnisse von Kishnani.

Eine wichtige Rolle im Abbau und Ausschleusen von Makroproteinen aus der Zelle haben die Autophagen. So soll neben dem Mangel an GAA und dem daraus resultierenden fehlenden Glykogenabbau, zusätzlich eine Störung der Autophagie zu dem Krankheitsbild M. Pompe beitragen. Die Autophagie ist ein intrazellulärer Prozess zum Abbau defekter oder überschüssiger Proteine und Zellorganellen (Lammens et al., 2009; Raben et al., 2012). In einer Studie von Raben et al aus dem Jahr 2012 wurden sowohl im Mausmodell als auch anhand Muskelbiopsien betroffener Patienten nachgewiesen, dass sich innerhalb der Muskelfasern neben den mit Glykogen gefüllten und teilweise vakuolisierten Lysosomen auch große Ansammlungen an „unverdauten“ Autophagen befinden. Um die Autophagen visuell darzustellen wurde ein Protein (MAP1LC3) identifiziert, welches dann mittels eines

Markers im Elektronenmikroskop dargestellt werden konnte. Es kann anhand dieser Studie vermutet werden, dass ein gestörtes „Recycling System“ (Autophagie) ebenfalls zu einem schlechten Therapieansprechen führen kann. In einem Mausmodell wurde ein kritisches Autophagie-Gen (Atg7) unterdrückt (Knockout Maus) und es kam in der Skelettmuskulatur zu einer deutlichen Reduktion des Glykogengehaltes. Zum jetzigen Zeitpunkt kann jedoch nicht sicher geklärt werden, wie das noch verbleibende Glykogen ohne funktionierende Autophagie in die Lysosomen befördert wird. Abschließend folgert Nina Raben, dass eine Kombination aus ERT und Unterdrückung der Autophagie die beste Therapieoption wäre (Raben et al., 2012).

Ein wichtiger Zusammenhang bezüglich des unterschiedlichen Ansprechens auf die ERT hat sich auch durch den CRIM-Status der Patienten gezeigt. CRIM bedeutet cross-reaktives immunologisches Material und wurde erstmalig in Zusammenhang mit M. Pompe im Jahr 2001 von Amalfitano beschrieben (Amalfitano et al., 2001). In den Arbeiten von Kishnani et al. und Angelini et al. wird ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von cross-reaktivem immunologischen Material (CRIM) und dem Ansprechen auf die ERT gezeigt (Angelini et al., 2012; Kishnani et al., 2009). Da die CRIM-negativen Patienten keine Form des Enzym GAA herstellen, die CRIM-positiven Patienten jedoch residual funktionierende Enzyme bzw. nicht funktionierende Vorformen des Enzyms bilden können, kann erklärt werden, dass die CRIM-negativen Patienten Antikörper gegen das durch die ERT zugeführte Enzym GAA bilden. Es zeigt sich, dass CRIM negative Patienten zumeist einen hohen Antikörper Titer (rhGAA-IgG) haben, während CRIM positive Kinder keine und nur wenige Antikörper bilden und somit besser auf die Therapie ansprechen. In der Studie von Kishnani aus dem Jahr 2009 wurden 32 infantile Patienten untersucht, davon waren 11 CRIM-negativ und 21 CRIM-positiv. Es zeigte sich in allen klinischen Parametern ein besseres Ergebnis bei den CRIM-positiven Kindern (Amalfitano et al., 2001; Bali et al., 2012; Kishnani et al., 2009, 2012).

Weitere Faktoren eines schlechten Ansprechens auf die ERT sind z.B. bereits bei Beginn der ERT bestehende schwere irreparable Schädigungen des Muskelgewebes, die Dichte der auf das Enzym reagierenden Rezeptoren und die vorhandene Enzymrestaktivität (Kishnani et al., 2012).

5.2 Klassifizierung der morphologischen Veränderungen der untersuchten Muskelbiopsien

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob eine genaue Klassifizierung der morphologischen Veränderungen der erkrankten Skelettmuskulatur von kindlichen Patienten

mit Morbus Pompe eine Aussage darüber geben kann, wie der Verlauf der Erkrankung unter Enzyersatztherapie sein wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine genaue Klassifizierung der morphologischen Veränderungen und insbesondere der Glykogenablagerungen an kleinen Muskelbiopsieproben entwickelt. Abgeleitet an der Einteilung elektronenmikroskopischer Bilder von Thurberg (Thurberg et al., 2006) wurde eine Einteilung für lichtmikroskopische Bilder vorgenommen. Hier wurden sechs verschiedene Stadien unterschieden: Stadium 0 (normale Muskelfaser), über mehrere pathologische Stadien 1,2,3 (PAS positive Anteile) bis hin zu den hoch pathologischen Stadien 4 (gemischte Vakuolen (PAS positive und negativ)) und 5 (leere, PAS negative vakuolisierte Muskelfasern). Für die Untersuchung wurde eine PAS-Färbung an Semidünnschnitten aus in Kunststoff eingebettetem Gewebe etabliert, abgeleitet an der Färbung von Lynch (Lynch et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst mehrere Analyse-, Färbe- und Einbettmethoden miteinander verglichen, um eine bestmögliche Auswertung zu ermöglichen. Aufgrund einer sehr detaillierten Darstellung der Morphologie, bei der auch geringe PAS Ablagerungen dargestellt werden konnten, wurde die Auswertung an Semidünnschnitte (Glutaraldehydfixierten in Kunstharz eingebetteten Gewebe) mit einer PAS-Färbung und anschließender Richardsen Gegenfärbung durchgeführt.

Anhand dieser Färbungen wurde ein sogenannter Morphologischer Index (Mo-Index) etabliert, welcher die Ergebnisse der morphologischen Auswertung/ Stadieneinteilung der Muskelbiopsien anhand eines Wertes zusammenfasst und genau darstellt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Muskelveränderungen in einem Wert zusammengefasst werden können und dadurch einfacher mit klinischen Parametern wie z.B. dem klinischen Ansprechen korreliert werden können beziehungsweise Analysen statistisch durchgeführt werden können.

In den bisher veröffentlichten Studien wurden Muskelbiopsien von M. Pompe erkrankter Patienten morphologisch untersucht. Die Studien sind jedoch nur deskriptiv, das heißt die Morphologie wird nur beschrieben (Parkinson-Lawrence et al., 2010; Prater et al., 2013).

Im Vergleich dazu wurde in der vorliegenden Studie die Muskelpathologie anhand des Mo-Index genau quantifiziert und führte so zu Ergebnissen, die mit dem Ansprechen der Patienten auf die ERT sowie mit verschiedenen klinischen Parametern korreliert werden konnten.

Zusätzlich zu dem morphologischen Index wurden die PAS positiven Bereiche und der Anteil der Vakuolen in der Skelettmuskelfaser ausgewertet. Unserer Einschätzung nach weisen die am schwersten geschädigten Muskelfasern besonders viele Vakuolen auf. In der Studie von

Thurberg aus dem Jahr 2006 wurden Muskelbiopsien von acht infantilen Patienten mit Morbus Pompe vor und unter ERT lichtmikroskopisch auf den Anteil der PAS positiven Areale/ Glykogenablagerungen untersucht. Am Ende der Studie waren noch 2 der 8 Kinder am Leben, diese hatten unter Therapie weniger Glykogenablagerungen im Skelettmuskel als Kinder mit schlechtem klinischem Ansprechen d.h. eine gute Glykogen clearance. Bei diesen beiden Fällen wurde die Therapie zu einem frühen Zeitpunkt begonnen (4,7 und 3,1 Monate). Ein weiterer Patient mit ebenfalls frühem Therapiebeginn (4,8 Monate) jedoch zeigte ein schlechtes klinisches Ansprechen trotz Rückgang der Glykogenablagerungen (Thurberg et al., 2006). Dieses Ergebnis bestätigt unsere Theorie, dass neben den PAS positiven Glykogenablagerungen auch die vakuolisierten Bereich in eine morphometrische Analyse miteinbezogen werden müssen.

5.3 Korrelation der morphologischen Veränderungen mit dem Ansprechen auf die ERT

In der vorliegenden Arbeit wurden Muskelbiopsien von Kindern mit Morbus Pompe vor Beginn der ERT (n=10) und unter ERT untersucht (n=8). Die morphologischen Veränderungen wurden dann zwischen den drei Responsegruppen (R1: gutes Ansprechen, R2: mittleres Ansprechen und R3: schlechtes Ansprechen auf ERT) verglichen. Hier zeigten sich folgende Ergebnisse:

Unter ERT zeigten Kinder mit einem guten Ansprechen auf die ERT einen signifikant niedrigeren Mo-Index (MW=0,37; SEM= \pm 0,108) als Kinder mit einem mittleren Ansprechen (MW=3,3; SEM= \pm 0,0384) und einem schlechtem Ansprechen (MW=3,8; SEM= \pm 0,285). Werden überwiegend die schweren Veränderungen der Skelettmuskulatur zusammengefasst (Mo-Index high) haben die Kinder mit gutem klinischen Ansprechen im Mittel ein Mo-Index high von 0,1 (SEM= \pm 0,100), bei mittlerem klinischen Ansprechen einen Mittelwert von 1,77 (SEM= \pm 0,320) und bei schlechtem Ansprechen einen Mittelwert von 3,31 (SEM= \pm 0,295).

Diese Ergebnisse bestätigten somit unsere Hypothese, dass insbesondere der Anteil der stark pathologisch veränderten, vakuolisierten Muskelfasern mit Überwiegen der Stadien 4 und 5 (dargestellt durch den Mo-Index high) relevant für das Therapieansprechen sind. Bei einem Patienten (Pat.4) mit einem besonders schlechten klinischen Ansprechen- das Kind verstarb nach 9,5 Monaten unter ERT- zeigt die Analyse der Muskelpathologie einen sehr hohen Mo-Index (Mo-Index=4,08; Mo-Index high=3,6).

In Biopsien, welche vor ERT entnommen wurden, zeigten sich ähnlich signifikante Ergebnisse. In der Gruppe mit gutem Ansprechen (R1) auf ERT sind die Werte signifikant niedriger als im Vergleich zu den Patienten mit einem mittleren (R2) Ansprechen. So findet sich in der Gruppe R1 bezogen auf den Mo-Index Gesamt ein Mittelwert von 1,2

(SEM= \pm 0,452) und in der Gruppe R2 im Mittel ein Wert von 2,64 (SEM= \pm 0,384), sowie bezüglich des Mo-Index high in der Gruppe R1 ein Mittelwert von 0,04 (SEM= \pm 0,031) und in der Gruppe R2 ein Mittelwert von 1,61 (SEM= \pm 0,442). In der Respondergruppe 3 mit dem schlechtesten klinischen Ansprechen fanden sich im Vergleich zu den anderen Respondergruppen keine signifikanten Ergebnisse, aufgrund der geringen Fallzahl (n=2) ist eine statistische Auswertung schwierig. Es zeichnet sich jedoch ein Trend ab, in der Gruppe R3 mit dem schlechtesten Therapieansprechen fanden sich auch die höchsten Mo-Indizes: Mittelwert Mo-Index Gesamt: 2,73 (SEM= \pm 1,010) und Mo-Index high: 1,84 (SEM= \pm 1,195). Je schlechter das klinische Ansprechen, desto höher die Mo-Indizes, d.h. desto mehr pathologische Veränderungen fanden sich in den Muskelbiopsien.

Darüber hinaus wurden auch die Glykogenablagerungen in den Muskelbiopsien quantifiziert. Weniger signifikante Ergebnisse zeigten die Untersuchungen der rein PAS positiven Arealen sowohl vor als auch unter ERT. Im Gegensatz dazu fanden sich hoch signifikante Ergebnisse der PAS positiven Areale + vakuolisierte Muskelfasern bezogen auf das Therapieansprechen. Bei den Biopsien unter ERT war der Anteil der PAS positiven + vakuolisierten Areale der Gruppe R1 hoch signifikant niedriger als in der Gruppe R2 ($p=0,0003$) und sehr signifikant niedriger als in der Gruppe R3 ($p=0,0014$), vor ERT fand sich ein signifikant niedriger Anteil der PAS positiven + vakuolisierten Fläche in der Gruppe R1 als in der Gruppe R2 ($p=0,0206$). Auch bezüglich der rein vakuolisierten Fläche fanden sich signifikante Ergebnisse unter ERT: In der Gruppe R1 fand sich ein signifikant niedriger Anteil als in der Gruppe R2 ($p=0,0113$) ebenso ein hoch signifikant niedriger Anteil als in der Gruppe R3 ($p=0,0003$). Auch der vakuolisierte Anteil der Gruppe R2 war signifikant niedriger als der vakuolisierte Anteil der Gruppe R3 ($p=0,047$). In der Auswertung der Muskelbiopsien vor ERT zeigte sich ebenfalls ein signifikant niedrigerer Anteil der vakuolisierte Fläche der Gruppe R1 als in der Gruppe R2 ($p=0,0212$).

Diese Daten zeigen, dass eine genaue morphometrische Analyse der Skelettmuskulatur spezifischer ist als die reine Betrachtung der Glykogenclearance, da insbesondere die Muskelfasern mit schwerer Schädigung weniger Glykogenablagerungen aufweisen und stattdessen viele Vakuolen bilden. Bei alleiniger Betrachtung des PAS positiven Anteils zeigt sich in der schlechten Respondergruppe 3 ein vermeintlich „gesünderes“ Zellbild als bei der Gruppe R2. Dies vermittelt ein falsches Bild und liegt daran, bei Betrachtung des rein PAS positiven Anteils die hochpathologischen Vakuolen nicht erfasst werden. Die Daten bestätigen unsere Hypothese, dass die Anteile der vakuolisierten Muskeln eine große Rolle bezüglich des Therapieansprechens haben und so in einer standardisierten Auswertung mit bewertet werden müssen.

Der neu etablierte Mo-Index zeigt im Vergleich zur Analyse der Glykogenablagerungen (PAS positive Anteile) eine genauere Beurteilung der Muskelschädigung. Da die vorliegenden Ergebnisse nicht nur signifikante Unterschiede zwischen den Responsegruppen unter Therapie sondern auch vor der Therapie zeigen, ist der etablierte Mo-Index möglicherweise im Sinne eines prädiktiven Markers zur Abschätzung des klinischen Therapieerfolges nutzbar. Dieser Marker könnte bei der Entscheidung helfen, ob ein an M. Pompe erkrankter Patient die ERT beginnen sollte oder nicht bzw. ob man eine begonnen Therapie bei schlechtem klinischen Ansprechen abbrechen sollte. Gerade aus ethischer Sicht, ist es schwierig eine begonnene Therapie abzubrechen, da natürlich von Seiten der Eltern eine große Hoffnung besteht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der neu etablierte Mo-Index eine sehr gute Methode ist, um die morphometrischen Veränderungen in den untersuchten Muskelbiopsien zu klassifizieren. Zusätzlich zu dem klinischen Response lässt sich dadurch die Muskelpathologie mit verschiedenen klinischen Parametern (z.B. Laborparameter (CK- und BNP-Vielfache, Enzymaktivität), Werte der Echokardiographie (z.B. shortening fraction und LVPW)) korrelieren. Das wurde in den bisher publizierten Studien nicht gezeigt.

Die Korrelation zwischen den CK-Werten und den Mo-Indizes zeigte signifikante Ergebnisse. Dies unterstützt die Spezifität der neu etablierten Mo-Indizes. Die Analyse der anderen Parameter ergab keine statistisch signifikante Korrelation allerdings zeichnet sich ein Trend ab, so dass möglicherweise eine größere Kohorte an Patienten signifikante Ergebnisse bringen würde.

Bei einer überregionalen Studie kann der Mo-Index standardisiert eingesetzt werden und dadurch die Muskelveränderungen genau quantifiziert werden. Die morphologische Quantifizierung wurde an kleinem in Kunststoff eingebettetem Gewebe etabliert. Dies hat den Vorteil, dass die Kunstharzblöcke lange haltbar sind, einfach per Post zu transportieren sind und dadurch einfach auch für retrospektive Studien genutzt werden können. Außerdem wird so nur eine kleine Gewebemenge benötigt, sodass eine Probengewinnung über eine Stanzbiopsie möglich erscheint und somit weniger Risiken für die Patienten birgt.

Trotz der aktuell in der Literatur postulierten Meinung, dass die Muskelbiopsie in der heutigen Zeit kein zwingendes Diagnosekriterium für Morbus Pompe ist, zeigt unsere Studie die wichtige Rolle einer Muskelbiopsie auf. Somit sollte, insbesondere bei Patienten mit geringem Therapieansprechen, eine Muskelbiopsie durchgeführt werden. So kann mit Hilfe der morphologischen Ergebnisse im Sinne eines prädiktiven Markers eine Hilfestellung zur Entscheidung Fortsetzung/Beendigung der ERT geleistet werden. Die vorliegenden Daten

zeigen, dass nur eine geringe Menge an Gewebe für eine genaue und aussagekräftige Auswertung nötig ist. Somit wäre eine Stanzbiopsie zur Gewebeentnahme ausreichend und würde so das Risiko und die körperliche Belastung bei Gewebeentnahme für die betroffenen Kinder verringern.

Eine Einschränkung der vorliegenden Studie besteht in der geringen Fallzahl. Morbus Pompe ist eine seltene Erkrankung und daher ist es schwierig, eine große Anzahl an Muskelbiopsien zu erhalten. Insbesondere bei Kindern werden Muskelbiopsien selten durchgeführt, da zur Diagnose andere Verfahren wie z.B. der Trockenbluttest, die Analyse der Fibroblasten und die Genetik Vorrang haben. Die Studie analysiert retrospektiv die Muskelbiopsien, daher sind diese nicht zu einem definierten Zeitpunkt entnommen. Die Biopsien sind mit Ausnahme von 2 Fällen aus dem M. vastus lateralis entnommen worden.

Der klinische Marker, die Response, ist ein relativ subjektiver Wert und ist nicht immer durch denselben Arzt bestimmt worden. Dies war in der vorliegenden Arbeit durch die retrospektive Verarbeitung nicht möglich. Bei der Durchführung der vorliegenden Studie lagen leider keine Informationen über den CRIM-Status der untersuchten Kinder vor, sodass dieser Aspekt in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden konnte.

Die Korrelation verschiedener Laborparameter mit den morphologischen Veränderungen der Skelettmuskulatur (Mo-Indizes) zeigt nur bei den CK-Werten eine signifikante Korrelation. Eine geschädigte Muskulatur geht mit erhöhten CK-Werten einher, daher bestätigen diese Befunde die Aussagekraft der morphologischen Analyse. Bei den anderen Laborparametern (Enzymaktivität, kardiale Parameter z.B. BNP, SF und LVPW) gab es keine signifikanten Ergebnisse, es ist jedoch ein Trend zu erkennen. Möglicherweise würde eine größere Fallanzahl mit signifikanten Ergebnissen einhergehen.

So ist diese Studie als ein Grundstein zu sehen mit der Zukunftsaussicht, die etablierte Färbung und Auswertung mit Hilfe des Mo-Index an einem größeren Patientengut anzuwenden und so die Daten zu erhärten. Eine Auswertung von Muskelbiopsien adulter Patienten mit dem in dieser Arbeit etablierten Verfahren zur Quantifizierung pathologischer Veränderungen der Muskulatur wäre von großem Interesse. Eine Folgestudie ist bereits in Planung.

5.4 Morphometrische Analyseverfahren bei anderen lysosomalen Speichererkrankungen

In einer aktuellen Studie wurde der Therapieerfolg einer anderen lysosomalen Speichererkrankung (Morbus Fabry) durch Quantifizierung von Speicherprodukten verifiziert. Tondel et al. untersuchte in Nierenbiopsien die Ansammlung des Stoffwechselproduktes

Globotriaacylceramid (GL3). Es wurden 12 Patienten untersucht und es zeigte sich in den Nierenbiopsien nach 5 Jahren Enzyersatztherapie in den glomerulären Endothelzellen und den Mesangiumzellen keine Ablagerungen von GL3 mehr, bei einigen Patienten, die mit hochdosierter ERT behandelt wurden, waren sogar die Podozyten ablagerungsfrei. In keiner der Rebiopsien kam es zu einer Zunahme der GL3-Ablagerungen (Tondel et al., 2013).

So erhält möglicherweise eine morphometrische Quantifizierung wieder Bedeutung in der Diagnostik von Muskelerkrankungen insbesondere bei Glykogenosen. Die etablierte Methode könnte möglicherweise auf andere Glykogenspeichererkrankungen z. B. Morbus Anderson übertragen werden, bei der es auch zu einer deutlichen Glykogenablagerung im Muskel kommt.

6 Zusammenfassung

Morbus Pompe wurde erstmals im Jahre 1932 von dem niederländischen Pathologen Dr. JC Pompe an einem kleinen Kind mit auffälligen Glykogenablagerungen in den Organen beschrieben. Aufgrund eines Mangels des lysosomalen Enzyms GAA (α -1,4-Glucosidase) kommt es zu pathologischen Ablagerungen von Glykogen in den Lysosomen der Zellen und damit zu einem Funktionsverlust. Patienten mit einem GAA Mangel entwickeln eine Muskelerkrankung, wobei das klinische Bild sehr unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Je nach Altersbeginn wird eine infantile von einer late-onset Form (juvenil und adult) unterschieden, wobei die infantile Form den schwersten Verlauf hat und die Kinder ohne Behandlung vor dem 1. Lebensjahr an den Folgen einer Kardiomyopathie versterben. Seit dem Jahr 2006 steht eine Enzymersatztherapie (ERT) mit α -1,4-Glucosidase (rh-GAA, Myozyme ®) zur Verfügung. Das Ansprechen der Kinder auf die ERT ist jedoch sehr unterschiedlich. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher nicht vollständig verstanden. Ein Therapieabbruch bei fehlendem Ansprechen hat neben ethischen Aspekten auch einen ökonomischen Aspekt für das Gesundheitssystem, da die Therapie sehr teuer ist. Die Fragestellung der vorliegenden Doktorarbeit ist, ob eine Quantifizierung der morphologischen Veränderungen der Skelettmuskulatur in Muskelbiopsien von an M. Pompe erkrankten Kindern, Informationen über das Ansprechen auf die ERT und den Krankheitsverlauf gibt. Dafür wurde eine genaue Klassifizierung der morphometrischen Veränderungen am Skelettmuskelbiopsat etabliert. Die Quantifizierung der morphologischen Veränderungen wurde durch einen neu etablierten „Morphologischen Index“ (Mo-Index) ausgedrückt, wobei Muskelbiopsien von gesunden Kontrollpatienten einen Mo-Index von 0 bis 0,1 und erkrankte Patienten einen Mo-Index zwischen 0 und 5 haben, sowie durch die Unterscheidung in PAS positive, PAS negative und vakuolisierte Fläche.

Die untersuchten Muskelbiopsien stammen von betroffenen Kindern mit Morbus Pompe (infantil n=10; juvenil n=3) sowie 4 gesunden Kontrollen. Bei 5 Patienten wurde unter ERT eine Rebiopsie durchgeführt. Die Auswertung der Muskelbiopsien wurde mit dem klinischen Ansprechen (Response) der Kinder auf die ERT korreliert, wobei Muskelbiopsien vor Beginn der Therapie und unter Therapie untersucht wurden. Das klinische Ansprechen auf die ERT wurde in Response 1=gutes Ansprechen, Response 2=mittleres Ansprechen und Response 3=schlechtes Ansprechen unterteilt.

Die Ergebnisse zeigen, dass Patienten mit geringeren Muskelveränderungen (dargestellt durch die Mo-Indizes) ein besseres Ansprechen auf die Therapie haben als Patienten mit stark pathologischen Muskelveränderungen. Interessanterweise zeigen sich diese Ergebnisse nicht nur bei Biopsien, welche unter Therapie entnommen wurden, sondern auch vor Beginn der Therapie. Ebenso zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Therapieansprechen und dem Anteil der PAS positiven Fläche zusammen mit der

vakuolisierten Fläche, sowie dem alleinigen Vakuolenanteil. Somit ist eine komplette morphometrische Analyse der Skelettmuskulatur spezifischer als die alleinige Betrachtung der Glykogenclearance, da insbesondere die Muskelfasern mit schwerer Schädigung weniger Glykogenablagerungen aufweisen und stattdessen viele Vakuolen bilden. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Quantifizierung der Muskelveränderungen mit Hilfe des Mo-Index als möglicher prädiktiver Marker genutzt werden kann, um eine Entscheidung für oder gegen ERT zu treffen.

7 Summary

Pompe disease was first described in 1932 by the Dutch pathologist Dr. JC Pompe. The disease occurs due to a lack of the lysosomal enzyme α -1,4-glucosidase (GAA) leading to pathological glycogen deposits in the lysosomes of the cell, and thus a functional loss of the affected cells. Patients with GAA deficiency develop a progressive muscle disease with a heterogeneous clinical disease course. Depending on the age of onset two phenotypes are distinguished: the infantile and the late-onset (juvenile and adult). The infantile phenotype has the worst progress. Children without treatment die from cardiomyopathy within the first year of life. Since 2006, an enzyme replacement therapy (ERT) with recombinant human α -1,4-glucosidase (rh-GAA, Myozyme®) is available. However, the clinical response of the children to ERT varies. The underlying mechanisms are not fully understood. Discontinuing ERT in the absence of a response has both ethical as well as economic aspects for the healthcare system because treatment is very expensive.

The aim of this dissertation was to investigate whether an exact classification of the morphological changes in the muscle biopsies of affected children with Pompe disease would give information about the clinical response and the disease progress following enzyme replacement therapy. Therefore a precise classification of morphometric changes in skeletal muscle biopsies was established. The quantification of morphological changes is expressed by a newly established "Morphological Index" (Mo-Index), where muscle biopsies from healthy control patients have a Mo-Index of 0 and severely affected patients have a Mo-Index between 3-5.

In this study, 13 muscle biopsies of affected children with Pompe disease (infantile n=10; juvenile n=3), 4 healthy control biopsies and, in addition, 5 re-biopsies under ERT were examined. The morphological analyses of these muscle biopsies before and during ERT was correlated with the clinical outcome (response) of the children following ERT. The clinical response to ERT was subdivided into response 1=good response, response 2=medium response and response 3=bad response. The results show that patients with subtle muscle changes have a better response to ERT than patients with severe pathological muscle changes. Interestingly, these results were not only seen in biopsies taken during treatment, but also in biopsies before ERT. The results suggest that the quantification of the muscle changes can be used as a potential predictive marker for the decision on ERT.

In addition, there is a clear correlation between the response to treatment and the percentage of PAS positive and vacuolated area, as well as the only vacuolated area.

Thus, a complete morphometric analysis of skeletal muscle is more detailed as only the glycogen clearance, especially because the muscle fibers with severe damage have less glycogen deposits and instead more vacuoles.

8 Abkürzungsverzeichnis

AIMS	Alberta infantmotorscale
CHO	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters
CRIM	cross-reaktives immunologisches Material
CK	Creatinkinase
DBS	driedbloodspot
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiographie
EMG	Elektromyographie
ERT	Enzyersatztherapie
GAA	α -1,4-Glucosidase/ saure Maltase/ saure α -Glucosidase
GÖR	gastroösophagealer Reflux
GPT	Glutamat- Pyruvat-Transaminase = ALT (Alanin-Aminotransferase)
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase = AST (Aspartat-Aminotransferase)
HCM	hypertrophe Cardiomyopathie
KS-PAS	PAS gefärbte Kryostatschnitte
LVMI	Linksventrikulärer Massenindex
MB	Methylenblau
MEV	Muskelentwicklungsverlangsamung
Mo-Index	Morphologischer Index
MQF	M. quadripiceps femoris
MTA	M. tibialis anterior
MVL	M. vastus lateralis
rh-GAA	rekombinante humane α -1,4-Glucosidase
Res	Response (Ansprechen auf die Therapie)
R1	gutes Ansprechen auf die ERT
R2	mittleres Ansprechen auf die ERT
R3	schlechtes Ansprechen auf die ERT
SD-PAS	PAS gefärbte Semidünnschnitte
SF	Shortening fraction
QMFT	Quick motor funktion test

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht Glykogensynthese (Rassow et al., 2008)	2
Abbildung 2: Pathologie der Glykogenspeicherkrankheit Typ II (modifiziert nach Genzyme, 2005)	4
Abbildung 3: Kryostatschnitte von einer Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe: HE, PAS, saure Phosphatase-Reaktion (Ac.Ph.) und Lamp2-Immunhistochemie	9
Abbildung 4: Kardiale Echographie einer Patientin mit infantilem M. Pompe nach 12 Wochen (A) und nach 40 Wochen (B)	12
Abbildung 5: Überlebenswahrscheinlichkeit und klinisches Ansprechen infantiler Patienten unter ERT (Ploeg et al., 2008)	15
Abbildung 6: In Epon eingebettete Muskelbiopsie im Größenvergleich.....	23
Abbildung 7: Kryostatschnitte von Muskelbiopsien von einem gesunden Kind (A,C) und einem Patienten mit Morbus Pompe (B,D).....	25
Abbildung 8: Muskelbiopsie eines Patienten mit Morbus Pompe (Kryostatschnitte).....	26
Abbildung 9: PAS gefärbte Muskelbiopsie eines Patienten mit Morbus Pompe (Kryostatschnitt) mit Kontraststeigerung durch Gegenfärbung mit Lichtgrün (Vergrößerung x200).....	27
Abbildung 10: Gegenüberstellung Semidünnschnitte gesunder Muskel (A) und pathologischer Muskel (B) mit PAS-Färbung.	28
Abbildung 11: Morphologische Veränderungen von Muskelfasern eines Patienten mit infantilem M. Pompe (Pat.2 Biopsie 2), KS-PAS Dimedon (A) und SD-PAS (B), Vergrößerung x200	29
Abbildung 12: Morphologische Veränderungen von Muskelfasern eines Patienten mit infantilem M. Pompe (Pat.3 Biopsie 2), KS-PAS Dimedon (A) und SD-PAS (B), Vergrößerung x200	29
Abbildung 13: PAS gefärbter Semidünnschnitt: Bei der Auswertung MA1 werden die einzelnen Muskelfasern einem Stadium zugeordnet (Vergrößerung x400)	32
Abbildung 14: PAS gefärbter Semidünnschnitt: Auswertung MA2 mit Punkteraster (Vergrößerung x200)	35
Abbildung 15: PAS gefärbter Semidünnschnitt: Auswertung MA3 mit Punkteraster (Vergrößerung x200)	37
Abbildung 16: Graphische Darstellung des Vergleichs der morphologischen Stadieneinteilung nach MA1 und MA2 an KS-PAS Dimedon und SD-PAS einer Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.2 Biopsie 2) mit leichtgradigen morphologischen Veränderungen (Mo-Index Gesamt=0,47).....	43
Abbildung 17: Vergleich der morphologischen Stadieneinteilung nach MA1 (in Prozent der Muskelfasern) und MA2 (in Prozent der Kreuze) an KS-PAS Dimedon und SD-PAS einer	

Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.3 Biopsie 2) mit starken morphologischen Veränderungen (Mo-Index Gesamt=3,38).	44
Abbildung 18: Graphische Darstellung der PAS-Ablagerungen und Vakuolen an KS-PAS Dimedon und SD-PAS einer Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.2 Biopsie 2) mit leichtgradigen morphologischen Veränderungen.	46
Abbildung 19: Vergleich der PAS-Ablagerungen und Vakuolen nach MA3 (in Prozent der Kreuze) an KS-PAS Dimedon und SD-PAS einer Muskelbiopsie eines stark betroffenen Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.3 Biopsie 2) mit starken morphologischen Veränderungen.....	47
Abbildung 20: Vergleich der pathologischen Veränderungen der Skelettmuskulatur (Mo-Index Gesamt) der Kontrollgruppe und Patienten mit Morbus Pompe mit einem unterschiedlichen Response auf die ERT	48
Abbildung 21: Infantiler Patient mit gutem klinischen Ansprechen auf die ERT (R1) (Pat. 2; Biopsie 1 und 2)	50
Abbildung 22: Infantiler Patient mit gutem klinischen Ansprechen auf die ERT (R1) (Pat.10)	51
Abbildung 23: Juveniler Patient mit gutem klinischen Ansprechen auf die ERT (R1) (Pat.12, Biopsie 1-3).....	52
Abbildung 24: Infantiler Patient mit mittlerem klinischen Ansprechen auf die ERT (R2) (Pat.1 Biopsie 1 und 2)	53
Abbildung 25: Infantiler Patient mit mittlerem klinischen Ansprechen auf die ERT (R2) (Pat.3; Biopsie 1 und 2)	54
Abbildung 26: Juveniler Patient mit mittlerem klinischen Ansprechen auf die ERT (R2) (Pat.11; Biopsie 1 und 2)	55
Abbildung 27: Infantiler Patient mit schlechtem klinischen Ansprechen auf die ERT (R3) (Pat.8)	56
Abbildung 28: Infantiler Patient mit schlechtem klinischen Ansprechen auf die ERT (R3) (Pat.4)	57
Abbildung 29: Mo-Index Gesamt der Muskelbiopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Pompe mit infantiler und juveniler Verlaufsform mit Mittelwert, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)	61
Abbildung 30: Mo-Index high der Muskelbiopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Pompe mit infantiler und juveniler Verlaufsform mit Mittelwert, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)	62
Abbildung 31: Anteil der PAS positiven Fläche (Glykogenablagerung) der Muskelbiopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Pompe mit infantiler und juveniler Verlaufsform mit Mittelwert, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)	63

Abbildung 32: Anteil der Vakuolen in Muskelbiopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Pompe mit infantiler und juveniler Verlaufsform mit Mittelwert, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)	63
Abbildung 33: Morphologische Veränderungen in vor Beginn der ERT entnommenen Biopsien (Mo-Index Gesamt) und klinisches Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, SEM (Standardfehler) und Signifikanz (*)	66
Abbildung 34: Morphologische Veränderungen in vor Beginn der ERT entnommenen Biopsien (Mo-Index high) und klinisches Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, SEM (Standardfehler) und Signifikanz (*)	66
Abbildung 35: Anteil der PAS positiven Fläche in vor Beginn der ERT entnommenen Biopsien bezogen auf das klinische Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, SEM (Standardfehler) und Signifikanz (*)	67
Abbildung 36: Anteil der vakuolisierten Fläche in vor Beginn der ERT entnommenen Biopsien bezogen auf das klinische Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, SEM (Standardfehler) und Signifikanz (*)	68
Abbildung 37: Anteil der PAS positiven und vakuolisierten Fläche in vor Beginn der ERT entnommenen Biopsien bezogen auf das klinische Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, SEM (Standardfehler) und Signifikanz (*)	68
Abbildung 38: Morphologische Veränderungen in unter ERT entnommenen Biopsien (Mo-Index Gesamt) und klinisches Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)	71
Abbildung 39: Morphologische Veränderungen in unter ERT entnommenen Biopsien (Mo-Index high) und klinisches Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)	71
Abbildung 40: Anteil PAS positiver Fläche in unter ERT entnommenen Biopsien bezogen auf das klinische Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)	72
Abbildung 41: Anteil vakuolisierte Fläche in unter ERT entnommenen Biopsien bezogen auf das klinische Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)	72
Abbildung 42: Anteil PAS positiver und vakuolisierte Fläche in unter ERT entnommenen Biopsien bezogen auf das klinische Ansprechen auf die ERT (R1, R2, R3) mit Darstellung des Mittelwerts, Standardfehler (SEM) und Signifikanz (*)	73
Abbildung 43: Korrelation der initialen Mo-Indizes mit dem BNP-Vielfachen des altersentsprechenden Normwertes	79
Abbildung 44: Korrelation der initialen Mo-Indizes mit dem LVPW in mm	79
Abbildung 45: Korrelation der initialen Mo-Indizes mit der shortening fraction in %	80

Abbildung 46: Korrelation der initialen Mo-Indizes mit dem CK-Vielfachen des altersentsprechenden Normwertes	80
Abbildung 47: Korrelation der initialen Mo-Indizes mit der Enzymaktivität (GAA-Aktivität) in mU/mg	81

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Glykogenosen (modifiziert nach Zierz et al., 2003)	2
Tabelle 2: Übersicht der Verlaufsformen bei Morbus Pompe (modifiziert nach Genzyme, 2007; Hirschorn et al., 2001)	4
Tabelle 3: Klinische Befunde bei infantilen Patienten mit einer klassischen Verlaufsform (Slonim et al., 2000)	6
Tabelle 4: Klinische Befunde bei infantilen Patienten mit einer nicht-klassischen Verlaufsform (Slonim et al., 2000)	6
Tabelle 5: Übersicht der Vor- und Nachteile der verschiedenen diagnostischen Methoden bei Morbus Pompe	14
Tabelle 6: Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit infantilem Morbus Pompe mit und ohne ERT (Nicolino et al., 2009)	16
Tabelle 7: Übersichtstabelle der klinischen Daten der untersuchten Patienten	21
Tabelle 8: Stadieneinteilung der pathologischen Veränderungen am Skelettmuskel für die Analyse MA1 und MA2 (PAS gefärbte Semidünnschnitte; Vergrößerung x400)	31
Tabelle 9: Beispiel der Stadieneinteilung der Muskelpathologie mit Auswertungsmethode MA1 (Patient 1 Biopsie 1)	33
Tabelle 10: Beispiel der Stadieneinteilung der Muskelpathologie mit Auswertungsmethode MA2 (Pat.1 Biopsie 1)	36
Tabelle 11: Beispiel des Glykogen- und Vakuolenanteils mit Auswertungsmethode MA3 (Pat. 1 Biopsie 1)	38
Tabelle 12: Anzahl der ausgewerteten Bilder und morphologischer Besonderheiten aller ausgewerteter Muskelgewebsschnitte	39
Tabelle 13: Vergleich der morphologischen Stadieneinteilung nach MA1 und MA2 an KS-PAS Dimedon und SD-PAS gefärbten Schnitten einer leicht betroffenen Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.2 Biopsie 2; Mo-Index Gesamt=0,47).	42
Tabelle 14: Graphische Darstellung des Vergleich der morphologischen Stadieneinteilung nach MA1 und MA2 an KS-PAS Dimedon und SD-PAS gefärbten Schnitten einer Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.3 Biopsie 2; Mo-Index Gesamt=3,38).	44
Tabelle 15: Vergleich der PAS-Ablagerungen bzw. leere Vakuolen nach MA3 an KS-PAS Dimedon und SD-PAS einer Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.2 Biopsie 2) mit leichtgradigen morphologischen Veränderungen.	46
Tabelle 16: Vergleich der PAS-Ablagerungen bzw. Vakuolen nach MA3 an KS-PAS Dimedon und SD-PAS einer Muskelbiopsie eines Patienten mit infantilem Morbus Pompe (Pat.3 Biopsie 2) mit starken morphologischen Veränderungen.	47

Tabelle 17: Zusammenfassung der Daten aller ausgewerteten Muskelbiopsien von Patienten mit Morbus Pompe mit unterschiedlicher Verlaufsform	60
Tabelle 18: Übersicht über die untersuchten Patienten mit Ergebnissen der morphologischen Auswertung der initialen Biopsien und des klinischen Response auf die ERT mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SEM) ohne die * Patienten (initial unter ERT entnommenen Biopsien).....	65
Tabelle 19: Übersicht über die untersuchten Patienten mit Ergebnissen der morphologischen Auswertung unter ERT und des Response mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SEM)	70
Tabelle 20: Morphologische Veränderungen der Rebiopsien unter ERT (Stadien 4 und 5, PAS Positivität, Vakuolen, PAS Positivität plus Vakuolen, Mo-Index Gesamt und Mo-Index high)	75
Tabelle 21: Übersicht der untersuchten Fälle der Patienten mit M. Pompe mit Mo-Index Gesamt, Mo-Index high und verschiedene klinischen Parametern.....	78

11 Literaturverzeichnis

Al-Lozi, MT, Amato, AA, Barohn, RJ, Cupler, EJ, Kishnani, PS, Leshner, RT, &

Mozaffar, T. (2009). Diagnostic Criteria for late-onset Pompe Disease.

Muscle&Nerve, **40(1)**, 149–160.

Amalfitano, A., Bengur, AR, Morse, RP, Majure, JM, Case, LE, Veerling, DL, Mackey, J.,

Kishnani, P., Smith, W., McVie-Wylie, A., Sullivan, JA, Hoganson, GE, Phillips,

JA, Schaefer, GB, Charrow, J., Ware, RE, Bossen, EH, & Chen, YT. (2001).

Recombinant human acid α -glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: Results of a phase I/II clinical trial. *Genetics IN Medicine*, **3(2)**, 132–138.

Angelini, C., & Semplicini, C. (2012). Enzym replacement therapy in pompe disease.

Current Neurology and Neuroscience Report, **12(1)**, 70–75.

Bali, DS, Goldstein, JL, Banugaria, S., Dai, J., Mackey, J., Rehder, C., & Kishnani, PS.

(2012). Predicting cross-reactive immunological material (CRIM) status in Pompe disease using GAA mutations. *American Journal of Medical Genetics*, **160C(1)**, 40–49.

Byrne, BJ, Falk, DJ, Pacak, CA, Nayak, S., Herzog, RW, Elder, ME, Collins, SW, Conlon,

TJ, Clement, N., Cleaver, BD, Cloutier, DA, Porvasnik, SL, Islam, S., Elmallah,

MK, Martin, A., Smith, BK, Fuller, DD, Lawson, LA, & Mah, CS. (2011). Pompe disease gene therapy. *Human molecular genetics*, **20**, 61–68.

Chien, YH, Chiang, SC, Zhang, XK, Keutzer, J., Lee, NC, Huang, AC, Chen, CA, Wu, MH,

Huang, PH, Tsai, FJ, Chen, YT, & Hwu, WL. (2008). Early Detection of Pompe Disease by Newborn Screening Is Feasible: Results From the Taiwan Screening Program. *Pediatrics*, **122(1)**, 39–45.

Cook, AL, Kishnani, PS, Carboni, MP, Kanter, RJ, Chen, YT, Ansong, AK, Kravitz, RM,

Rice, H., & Li, JS. (2006). Ambulatory electrocardiogram analysis in infant treated with recombinant human acid α -glucosidase enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Genetics IN Medicine*, **8(5)**, 313–317.

- DeRuisseau, L., Fuller, DD, Qiu, K., DeRuisseau, KC, Donnelly, WH, Mah, C., Reier, PJ, & Byrne, BJ.** (2009). Neural deficits contribute to respiratory insufficiency in Pompe disease. *Proceedings of the national academy of sciences*, **106(23)**, 9419–9424.
- Di Rocco, M., Buzzi, D., & Tarò, M.** (2007). Glycogen storage disease type II: clinical overview. *Acta Myologica*, **26(1)**, 42–44.
- Douillard-Guilloux, G., Raben, N., Takikita, S., Batista, L., Caillaud, C., & Richard, E.** (2008). Modulation of glycogen synthesis by RNA interference: towards a new therapeutic approach for glykogenosis type II. *Human molecular genetics*, **17(24)**, 3876–3886.
- Dubowitz, Victor.** (2007). *Muscle Biopsy*. Elsevier.
- Fernandes, J.** (1995). The history of the glycogen storage diseases. *European journal of pediatrics*, **154(6)**, 423–424.
- Fukuda, T., Roberts, A., Plotz, P., & Raben, N.** (2007). Acid alpha-glucosidase deficiency (Pompe disease). *Current Neurology and Neuroscience Reports*, **7(1)**, 71–77.
- Genzym.** (2009). Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels Myozyme (Fachinformation).
- Genzyme.** (2005). Leitfaden für Ärzte zu Morbus Pompe.
- Genzyme.** (2007). Produktmonographie: Enzyersatztherapie bei Morbus Pompe.
- Goldstein, JL, Young, SP, Changela, M., Dickerson, GH, Zhang, H., Dai, J., Peterson, D., Millington, DS, Kishnani, PS, & Bali, DS.** (2009). Screening for Pompe disease using a rapid dried blood spot method: experience of a clinical diagnostic laboratory. *Muscle&Nerve*, **40(1)**, 32–36.
- Herold, Gerd.** (2009). *Innere Medizin*. Gerd Herold Verlag.
- Hers, HG.** (1963). Alpha-Glucosidase Deficiency in Generalized Glykogen-Storage Disease. *Biochemical Journal*, **86**, 11–16.
- Hirschorn, R., & Reuser, A.** (2001). Glycogen storage disease type II: Acid alpha glucosidase (Acid maltase) deficiency. In *The Metabolic and Molecular bases of inherited disease* (pp. 3389–3420). McGraw-Hill.

- Horn, F.** (2005). *Biochemie des Menschen*. Thieme Verlag.
- Kemper, A., Hwu, WL, Lloyd-Puryear, M., & Kishnani, PS.** (2007). Newborn screening for Pompe disease: Synthesis of the Evidence and Development of Screening Recommendations. *Pediatrics*, **120(5)**, 1327–1334.
- Kiang, A., & Amalfitano, A.** (2007). Progress and problems when considering gene therapy for GSD-II. *Acta Myologica*, **26(1)**, 49–52.
- Kishnani, PS, Amartino, HM, Lindberg, C., Miller, TM, Wilson, A., & Keutzer, J.** (2013). Timing of Diagnosis of Patients with Pompe Disease: Data from the Pompe Registry. *American Journal of medical genetics*, **161(10)**, 2431–2443.
- Kishnani, PS, Beckemeyer, A., & Mendelsohn, N.** (2012). The new era of pompe disease: Advances in the detection, understanding of the phenotypic spectrum, pathophysiology and management. *American Journal of Medical Genetics*, **160C(1)**, 1–7.
- Kishnani, PS, Corzo, D., Nicolino, M., Byrne, B., Mandel, H., Hwu, WL, Leslie, N., Levine, J., Spencer, C., McDonald, M., Li, JS, Dumontier, J., Halberthal, M., Chien, YH, Hopkin, R., Gruskin, D., Bartholomew, D., van der Ploeg, A., Clancy, JP, & Parini, R.** (2007). Recombinant human acid alpha-glucosidase: Major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology*, **68(2)**, 99–109.
- Kishnani, PS, Goldenberg, PC, DeArme, SL, Heller, J., Benjamin, D., Young, S., Bali, DS, Smith, SA, Li, JS, Mandel, H., Koeberl, D., Rosenberg, A., & Chen, YT.** (2009). Cross-reactive immunologic material status affects treatment outcomes in Pompe disease infants. *Molecular Genetics and Metabolism*, **99(1)**, 26–33.
- Kishnani, PS, Hwu, WL, Mandel, H., Nicolino, M., Yong, F., & Corzo, D.** (2006). A retrospective, multinational, multicenter study on the natural history of infantile-onset pompe disease. *The journal of Pediatrics*, **148(5)**, 671–676.
- Klinge, L., Straub, V., Neudorf, U., Schaper, J., Bosbach, T., Görlinger, K., Wallot, M., Richards, S., & Voit, T.** (2005). Safety and efficacy of recombinant acid alpha-

- glucosidase in patients with classical infantile Pompe disease: results of a phase II clinical trial. *Neuromuscular Disorders*, **15(1)**, 24–31.
- Kroos, MA, Pomponio, RJ, Hagemans, ML, Keulemans, LJ, Phipps, M., DeRiso, M., Palmer, RE, Ausems, MG, Van der Beek, NA, Van Diggelen, OP, Halley, DJ, van der Ploeg, A., & Reuser, A.** (2007). Broad spectrum of Pompe disease in patients with the same c.-32-13T->G haplotype. *Neurology*, **68(2)**, 110–115.
- Lammens, M., & Schooser, B.** (2009). Metabolische Myopathien. *Der Pathologe*, **30**, 370–378.
- Lukacs, Z., Nieves Cobos, P., Mengel, E., Hartung, R., Beck, M., Deschauer, M., Keil, A., & Santer, R.** (2009). Diagnostic efficiency of the fluorometric determination of enzyme activity for pompe disease from dried blood specimens compared with lymphocytes-possibility for newborn screening. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **33(1)**, 43–50.
- Lynch, CM, Johnson, J., Vaccaro, C., & Thurberg, BL.** (2005). High-resolution Light Microscopy (HRLM) and Digital Analysis of Pompe Disease Pathology. *Journal of Histochemistry&Cytochemistry*, **53(1)**, 63–73.
- Martin, JJ, de Barsy, T., van Hoof, F., & Palladini, G.** (1973). Pompe's disease: an inborn lysosomal disorder with storage of glycogen. *Acta neuropathy*, **23(3)**, 229–244.
- Mulisch, M., & Welsch, U.** (2001). *Romeis Mikroskopische Techniken*. Urban & Fischer.
- Müller-Felber, W., Horvath, R., Gempel, K., Podskarbi, T., Shin, Y., Pongratz, D., Walter, MC, Baethmann, M., Schlotter-Weigel, B., Lochmüller, H., & Schooser, B.** (2007). Late onset Pompe disease: Clinical and neurophysical spectrum of 38 patients including long-term follow-up in 18 patients. *Neuromuscular disorders*, **17(9-10)**, 698–706.
- Nicolino, M., Byrne, B., Wraith, JE, Leslie, N., Mandel, H., Freyer, DR, Arnold, GL, Pivnick, EK, Ottinger, CJ, Robinson, PH, Loo, JC, Smitka, M., Jardine, P., Tatò, L., Chabrol, B., McCandless, S., Kimura, S., Mehta, L., Bali, D., Skrinar, A., Morgan, C., & Rangachari, L.** (2009). Clinical outcomes after long-term treatment

with alglucosidase alfa in infants and children with advanced Pompe disease.

Genetics in Medicine, **11(3)**, 210–219.

Parkinson-Lawrence, E., Shandala, T., Prodoehl, M., Plew, R., Borlace, GN, & Brooks,

DA. (2010). Lysosomal Storage Disease: Revealing lysosomal function and physiology. *Physiology*, **25(2)**, 102–115.

Ploeg, AT, & Reuser, A. (2008). Lysosomal storage disease: Pompe's disease. *Lancet*,

372(9646), 1342–1353.

Pompe Center Erasmus MC. (2014, July 9). Retrieved from

<http://cluster15.erasmusmc.nl/klgn/pompe/mutations.html?lang=en>

Pompe, JC. (1932). Over ideopathische hypertrophie van het hart. *Ned Tijdschr Geneeskd*,

76, 304–311.

Prater, S., Patel, TT, Buckley, AF, Mandel, H., Vlodayski, E., Banugaria, SG, Feeney, EJ,

Raben, N., & Kishnani, PS. (2013). Skeletal muscle pathology of infantile Pompe disease during long-term enzyme replacement therapy. *Orphanet Journal of rare disease*, **8(1)**, 90.

Raben, N., Wong, A., Ralston, E., & Myerowitz, R. (2012). Autophagy and Mitochondria in

Pompe Disease: Nothing is so new as what has long been forgotten. *American Journal of Medical Genetics*, **160C(1)**, 13–21.

Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. (2008). Biochemie. Thieme Verlag.

Rohrbach, M., Klein, A., Köhli-Wiesner, A., Veraguth, D., Scheer, I., Balmer, C.,

Lauener, R., & Baumgartner, MR. (2010). CRIM-negative infantile Pompe disease: 42-month treatment outcome. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **33(6)**, 751–757.

Rossi, M., Parenti, G., Della Casa, R., Romano, A., Mansi, G., Agovino, T., Rosapepe,

F., Vosa, C., Del Giudice, E., & Andria, G. (2007). Long-term enzyme replacement therapy for pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase derived from chinese hamster ovary cells. *Journal of Child Neurologie*, **22(5)**, 565–573.

Rote Liste. (2014, July 14). Retrieved from <http://www.rote-liste.de/>

- San Millan, B., Teijeira, S., Domínguez, C., Vieitez, I., & Navarro, C.** (2010). Chorionic villi ultrastructure in the prenatal diagnosis of glycogenosis typ II. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **33(3)**, 105–111.
- Schöpfer, K., Miebach, E., Beck, M., & Pitz, S.** (2011). Lysosomale Speichererkrankungen - Update und neue therapeutische Optionen. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, **228(2)**, 144–160.
- Schoser, B.** (2007). Glykogenspeichererkrankung Typ 2 - Morbus Pompe. *Aktuelle Neurologie*, **34(5)**, 283–290.
- Schoser, B., Müller-Höcker, J., Horvath, R., Gempel, K., Pongratz, D., Lochmüller, H., & Müller-Felber, W.** (2007). Adult-onset glycogen storage disease type 2: clinico-pathological phenotype revisited. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, **33(5)**, 544–559.
- Schrank, B.** (2009). CME Morbus Pompe/ Glykogenose Typ II. Thieme Verlag.
- Slonim, AE, Bulone, L., Ritz, S., Goldberg, T., Chen, A., & Martiniuk, F.** (2000). Identification of two subtypes of infantile acid maltase deficiency. *Journal of Pediatrics*, **137(2)**, 283–285.
- Thurberg, BL, Lynch, CM, Vaccaro, C., Afonso, K., Tsai, AC, Bossen, E., Kishnani, PS, & O'Callaghan, M.** (2006). Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for pompe disease. *Laboratory Investigation*, **86(12)**, 1208–1220.
- Tondel, C., Bostad, L., Larsen, KK, Hirth, A., Vikse, BE, Houge, G., & Svarstad, E.** (2013). Agalsidase benefits renal histology in young patients with Fabry disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, **24(1)**, 137–148.
- Van Capelle, CI, van der Beek, NA, Hagemans, ML, Arts, WF, Hop, WC, Lee, P., Jaeken, J., Frohn-Mulder, IM, Merkus, PJ, Corzo, D., Puga, AC, Reuser, A., & van der Ploeg, A.** (2010). Effect of enzym therapy in juvenil patients with Pompe disease: A three-year open-label study. *Neuromuscular disorders*, **20(12)**, 775–782.
- Van den Hout, HM, Hop, W., van Diggelen, OP, Smeitink, JA, Smit, GP, Poll-The, BT, Bakker, HD, Loonen, MC, de Klerk, JB, Reuser, A., & van der Ploeg, A.** (2003).

The natural course of infantile Pompe's disease: 20 original cases compared with 133 cases from literature. *Pediatrics*, **112(2)**, 332–340.

Van den Hout, HM, Reuser, A., de Klerk, JB, Arts, WF, Smeitink, JA, & van der Ploeg, A. (2000). Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients. *Lancet*, **356(9227)**, 397–408.

Winchester, B., Bali, D., Bodamer, OA, Caillaud, C., Christensen, E., Cooper, A., Cupler, E., Deschauer, M., Fumić, K., Jackson, M., Kishnani, PS, Lacerda, L., Ledvinová, J., Lugowska, A., Lukacs, Z., Maire, I., Mandel, H., Mengel, E., Müller-Felber, W., Piraud, M., & Reuser, A. (2007). Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: Report from an international consensus meeting. *Molecular Genetics and Metabolism*, **93(3)**, 275–281.

Winkel, L., Kamphoven, J., Van den Hout, H., Severijnen, LA, van Doorn, PA, Reuser, A., & van der Ploeg, A. (2003). Morphological changes in muscle tissue of patients with infantile Pompe's disease receiving enzyme replacement therapy. *Muscle Nerve*, **27**, 743–51.

Zierz, S., & Jerusalem, F. (2003). *Muskelerkrankungen*. Thieme Verlag.

12 Anhang

12.1 Rezepte

12.1.1 Rezepte für Paraffinschnitte

Rezept 1: Schaffersche Lösung zur Vorbereitung der Paraffinschnitte:

20 ml 37% Formol + 60 ml 80% Alkohol

Das in Schafferscher Lösung fixierte Gewebe wird für 24 h im Kühlschrank gelagert.

Rezept 2: Handeinbettung der Paraffinschnitte:

- 30 Minuten in 80 % Alkohol
- 2x 30 Minuten in 96 % Alkohol
- 2x 30 Minuten in 100 % Alkohol
- 2x 30 Minuten in Xylol
- 2x 30 Minuten in Paraffin
- anschließend ausgießen

Rezept 3: PAS Färbung auf alkoholischer Basis:

- Paraffinschnitte entparaffinieren: 2x Xylol 5 min, absteigende Alkoholreihe (100 % 2 min, 96% 2 min, 70% 2 min)
- 5 min in alkoholischer Perjodsäure (siehe Rezept 6)
- spülen mit 70% Alkohol
- 2 x 2 min 70% Alkohol
- mit 96% Alkohol spülen
- 5% Dimedon in 100%Alkohol (z.B. 2 Gramm Dimedon auf 40 ml 100% Alkohol) für 24 h bei 60 Grad
- 2x mit 96% Alkohol spülen
- kurz mit 70% Alkohol spülen
- in Schiffsches Reagenz 10 min
- 3x mit LW spülen
- kurz in Aqua des.
- 38 ml Aqua des. mit 2 ml Richardson Lösung mischen (Verhältnis 19:1)
- mit dieser 1 min gegenfärben
- 2x in Aqua des. spülen
- kurz in 70% und 96% Alkohol
- 1 min in 100% Alkohol
- 2x Xylol
- eindecken

Rezept 4: alkoholische Perjodsäure:

- 13,6 g Natriumacetat in 500 ml Aqua des. gelöst = Natriumacetatlösung 0,2 M
- 0,4 g Perjodsäure in 10 ml Aqua des. gelöst
- 5 ml Natriumacetatlösung zugesetzt
- mit 5 ml 100% Alkohol gemischt

12.1.2 Rezepte für Kryostatschnitte

Rezept 5: PAS Färbung auf alkoholischer Basis:

- Gefrierschnitte vorbereiten: Schnitte 10 min trocknen, 10 min Aceton fixieren, 15 min trocknen
- 5 min in alkoholischer Perjodsäure (siehe Rezept 6)
- spülen mit 70% Alkohol
- 2 x 2 min 70% Alkohol
- mit 96% Alkohol spülen
- 5% Dimedon in 100%Alkohol (z.B. 2 Gramm Dimedon auf 40 ml 100% Alkohol) für 24 h bei 60 Grad
- 2x mit 96% Alkohol spülen
- kurz mit 70% Alkohol spülen
- in Schiffsches Reagenz 10 min
- 3x mit LW spülen
- kurz in Aqua des.
- 38 ml Aqua des. mit 2 ml Richardson Lösung mischen (Verhältnis 19:1)
- mit dieser 1 min gegenfärben
- 2x in Aqua des. spülen
- kurz in 70% und 96% Alkohol
- 1 min in 100% Alkohol
- 2x Xylol
- eindecken

Rezept 6: alkoholische Perjodsäure:

- 13,6 g Natriumacetat in 500 ml Aqua des. gelöst = Natriumacetatlösung 0,2 M
- 0,4 g Perjodsäure in 10 ml Aqua des. gelöst
- 5 ml Natriumacetatlösung zugesetzt
- mit 5 ml 100% Alkohol gemischt

12.1.3 Rezepte für Semidünnschnitte

Rezept 7: 3%iges Glutaraldehyd:

100ml Natriumhydrogenphosphat + 4ml Kaliumdihydrogenphosphat, davon 70ml + 10ml
25%iges Glutaraldehyd

Rezept 8: Fixation in Glutaraldehyd:

- 3 x 15 Minuten in Waschpuffer
- 2 Stunden in OS-Palladepuffer
- 15 Minuten in Palladepuffer
- 15 Minuten in 70% Alkohol
- über Nacht in 70% Alkohol
- 15 min in 70% Alkohol
- 2 Stunden kontrastiert
- 15 min in 70% Alkohol
- 15 min in 90% Alkohol
- 2 x 15 Min in 96% Alkohol
- 2 x 15 min in 100% Alkohol
- 30 Min in 100% Alkohol-Epoxypropangemisch
- 30 min in reines Epoxypropan
- 1 Stunde in Epoxypropan-Agar-Gemisch
- 2 Stunden in Agar 100 im Exicator
- 48 Stunden in Einbettformen bei 60 Grad Celsius

Rezept 9: PAS Färbung nach Lynch CM 2005:

- Schnitte 5 min in Aqua des. gewässert
- 5 min in 0,5 % Perjodsäure (0,05 Gramm auf 10 ml Aqua des.)
- gespült und 1 min in Leitungswasser
- 25 min in Schiffssches Reagenz
- 30 min Leitungswasser
- 15 sec gegengefärbt mit Richardson Lösung
- mit Aqua des. ab gespült

(Alle Schritte auf Steckofen bei ~ 60 Grad durchgeführt.)

Rezept 10: modifiziertes Rezept PAS Färbung:

- 6 min mit Richardson Lösung gefärbt (*nur diesen Schritt auf Ofen bei 60°*)
- gespült mit Aqua des (*ab jetzt nicht mehr auf Ofen*)
- 5 min 0,5 % Perjodsäure (0,05 Gramm Perjodsäure in 10 ml Aqua des.)

- gespült mit Aqua des.
- 15 min Schiffssches Reagenz
- 10 min in Leitungswasser gestellt

12.1.4 Rezepte Gegenfärbungen

Rezept 11: Lichtgrüne Färbung:

Die Gefrierschnitte werden nach Rezept 5 behandelt bis nach Einwirken des Schiffschen Reagenz. Danach

- 3x mit Leitungswasser spülen
- kurz in Aqua des.
- 40 sec in Lichtgrün
- in 1% Essigsäure spülen
- 2x2 min in 100% Alkohol
- 3x in Xylol
- eindecken

Rezept 12: Alkoholische Versilberung

- nach 24 h Dimedonbehandlung gespült in 96% Alkohol, dann kurz in 70% Alkohol
- 5 min in alkoholischer Kaliumpermanganatlösung (0,4 g Kaliumpermanganat + 40 ml 70% Alkohol)
- mit 70% Alkohol gespült
- 2 min entfärbt in 2% alkoholischer Oxalsäure (1 g Oxalsäure + 50 ml 70% Alkohol)
- mit 70% Alkohol gespült
- 5 min in 2,5 % alkoholischer Eisenalaunlösung (1,25 g Ammoniumeisen-III-sulfat + 50 ml 70% Alkohol)
- mit 70% Alkohol gespült
- 10 sec in ammoniakalischer Silberlösung gefärbt [4 ml alkoholische, 10% Silberlösung (1 g Silber + 10 ml 70% Alkohol) und 200 Mikroliter 40% Natronlauge mischen, Ammoniak tropfenweise dazugeben, bis Lösung sich wieder entfärbt. Mit 10 % Silberlösung rücktitrieren, bis Lösung wieder leicht bräunlich wird, danach mit 30 ml 70% Alkohol mischen].
- gut mit 70% Alkohol gespült
- 5 min in 5% Formol auf alkoholischer Basis (8 ml Formol + 72 ml 70% Alkohol)
- gespült mit 70% Alkohol
- 2 min in 2% alkoholischem Natriumthiosulfat (1g Natriumthiosulfat + 50 ml 70% Alkohol)
- gespült mit 70% Alkohol
- 20 min in Schiffssches Reagenz

- mit Leitungswasser gespült
- aufsteigende Alkoholreihe
- 2x Xylol
- eindecken

12.1.5 Dimedon und Diastasebehandlung

Rezept 13: Dimedonbehandlung auf alkoholischer Basis:

- Auftauen und Acteon fixieren/ entparaffinieren
- Perjodsäure 5 min, waschen mit 70% Alkohol, 3 h bei 60 Grad in Dimedon 5% in absolutem Alkohol
- Mit 70% Alkohol waschen
- PAS färben
- spülen, gegenfärben, aufsteigende Alkoholreihe, Xylol
- eindecken

Rezept 14: Diastasebehandlung auf alkoholischer Basis:

- 3 verschiedene Konz. 0,1 %, 0,5 %, 1,0% mit Ethanol 70% gemischt -> nicht so gut löslich (vor allem 1%)
- Schnitte jeweils entweder entparaffiniert oder aufgetaut und Aceton fix.
- Paraffin- und Gefrierschnitte 1 h bei 37 Grad eingelegt
- Mit 70% Alkohol gespült

Normale PAS-Färbung, Gefrierschnitte 10 min, Paraffinschnitte 15 min

12.2 Substanz- und Geräteliste

- **Aceton:** Emprove; Merck, Art-Nr. 1.00013.6025
- **Alkohol:** Ethylalkohol Sorte 522, Stockheimer Chemie
- **Aqua des.:** selbst aufbereitet durch Gerät von Millipore "Direct-Q"
- **Diastase** aus *Aspergillus oryzae*, 5110 U/g; Fluka, Art-Nr. 09962
- **Dimedon:** 5,5-Dimethyl-1,3-cyclohexandion, 95%, Aldrich, Art-Nr. D15, 330-3
- **Formol:** Formaldehydlösung 37%; Sigma-Aldrich, Art-Nr. 82270
- **Hämatoxylinblau** krist., Merck, Art-Nr. 1.04302.0100
- **Lichtgrün** SF gelblich, Certistain; Merck, Art-Nr. 1.15941
- **Löffler:** Methylenblau med. puriss; Division Chroma, Art-Nr. 1B429
- **Natriumacetat** krist.; Merck, Art-Nr. 1451500
- **Paraffin:** Paraplast; McCormick Scientific, Art-Nr. 501006
- **Perjodsäure:** Roth, Art-Nr. 3257.1
- **Richardson für Semidünnfärbung:** (Rezept 10)
 - Lösung A: 1% Azur II in Aqua des.
 - Azur II: Microscopy, Merck, Art-Nr. 9211 oder Fluka, Azure A, Art-Nr. 11665
 - Lösung B: 1% Methylblau in 1% Natriumtetraboratlösung (1g Methylenblau in 100 ml 1% Borax)
 - Methylenblau: Merck, Art-Nr. 1283
 - Borax: Di-Natriumtetraborat-Decahydrat, Art-Nr. T 8801
 - Lösungen A und B 1:1 mischen
- **Richardson für Gefrierschnittfärbung:** (Rezept 5)
 - Richardson für Semidünnfärbung im Verhältnis 1:19 mit Aqua des. verdünnen
- **Schiffssches Reagenz:** Microscopy, Merck K6aA, Art-Nr. 109033
- **Xylol:** Merck, Art-Nr. 8685
- **Tissue Teck:** Sakure O.T.C. Compound Containing
- **Objektträger:** R.Langensbrück
- **Mikrotom:** Leica CM 1950
- **Mikroskop:** Nikon Eclipse 80i

12.3 Poster 1



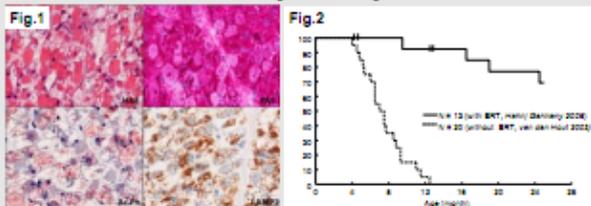
Morphological changes in muscle biopsies from patients with infantile and juvenile Pompe disease as a potential predictive marker for enzyme replacement therapy (ERT)

A.K. Pröbß¹, A. Hahn², C. Mühlfeld³, H. von Pein⁴, E. Mengel⁵, A. Schänzer¹

¹ Institute of Neuropathology, Justus Liebig University, Giessen; ² Department of Neuropediatrics, Justus Liebig University, Giessen; ³ Institute of Functional and Applied Anatomy, Hannover Medical School; ⁴ Department of Neuropathology, University Medical Center of JGU-University Mainz; ⁵ Villa Metabolica, University Medical Center of JGU-University Mainz

Patients with Pompe disease (glycogen storage disease type II) exhibit a variable degree of vacuolar myopathy with pathological glycogen deposits. Importantly, patients differ in their response to enzyme replacement therapy (ERT). In this study, we characterised and correlated the morphological changes with the clinical outcome following ERT. We analysed the muscle biopsies of 3 infantile and 2 juvenile patients with a second biopsy in 4 cases under ERT for at least 10 month. PAS stained cryosections and semithinsections were analysed for glycogen deposits with morphometric methods and the morphological alterations were classified with a modified score. Importantly, our results show that patients with a high degree of morphological changes in the initial muscle biopsy show a worse response to ERT as compared to patients with low initial pathology. These data suggest that the morphological characterisation of a muscle biopsy from patients with Pompe disease may predict the response to ERT and may therefore serve as a novel and potentially important predictive marker to direct the treatment of patients with Pompe disease. We plan on validating this hypothesis in a follow-up investigation of a larger group of patients.

Introduction: In lysosomal storage diseases pathological storage material occur in different amounts in the tissue. Until now the morphological diagnoses of Pompe disease in muscle biopsies were described as a vacuolar myopathy with pathogenic glycogen deposits (Fig.1) and no degree of the alterations was made. Since treatment is available (Fig.2) a classification of the morphological changes might be useful not only in second biopsies under treatment but initial before treatment to measure the degree of damage.



Material&methods: Muscle biopsies from Pompe patients were analysed for PAS+ deposits (Fig.3). The Quantification was performed with a Computer associated Stereology tool (new CAST). The morphological alterations were identified with a modified score (Fig.4). The analyses were performed at PAS stained Semithinsections from resin embedded material and the results were related to the clinical response to ERT.

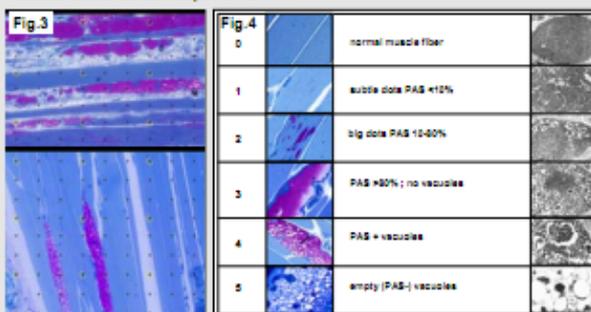


Fig. 5+6: Morphological quantification in one infantile patient with good response to ERT. The muscular alterations are summarized with a morphological score (MoS). $(0\% \times 0 + 20\% \times 1 + 57\% \times 2 + 20\% \times 3 + 1\% \times 5 + 1\% \times 5) / 100 = 2,05$. The morphological score „high“ (MoSh) summarizes only severe alterations (stage 4 and 5). $(1\% \times 4 + 1\% \times 5) / 100 = 0,10$

Results: Biopsies from 3 infantile Pompe patients with different response to ERT. R1=good, R2=moderate, R3=poor. A 2nd biopsy was performed under ERT in 2 patients.

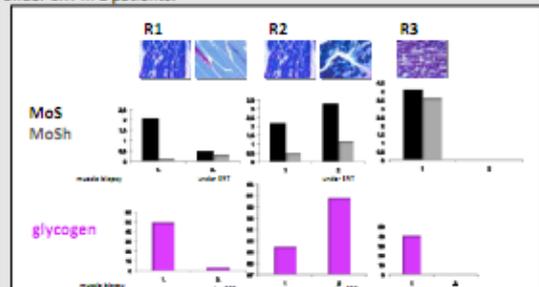


Fig.6: Second biopsies under ERT show an increase in glycogen deposits and morphological alterations (MoS) in R2 compare to R1. In the patient with R3 the initial glycogen and MoS was very high and he died early even under ERT before a 2nd biopsy could be taken.

Results: Initial biopsies from 5 patients with infantile and juvenile Pompe disease with different response to ERT.

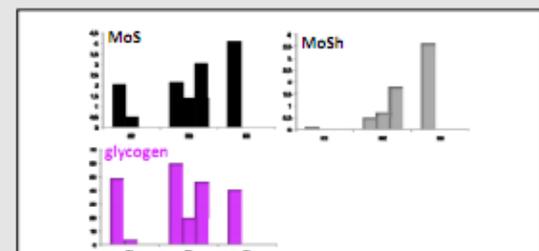


Fig.7: In initial muscle biopsies patients with a good clinical response to ERT (R1) have a lower MoS compare to patients with moderate (R2) and poor (R3) response. The PAS positive area is higher in R2 patients compared to R1 but is lower in R3 patients due to the higher number of empty vacuoles. Therefore the MoS is a more reliable marker compare to PAS+ deposits.

Conclusions: The study gives evidence that morphological alterations in the initial muscle biopsy before ERT correlate with the response to treatment and could therefore serve as a potentially predictive marker. The morphological characterisation can be classified by the newly established MoS at resin embedded material. An advantage of this method is that resin material can easily be send between clinics by mail. We currently validating the utility of MoS as a predictive marker in a higher number of patients.

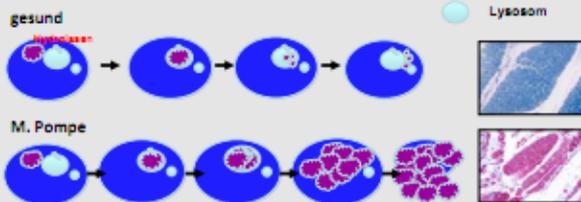
12.4 Poster 2

Quantifizierung morphologischer Veränderungen im Muskelbiopsat bei Patienten mit infantiler und früh juveniler Verlaufsform eines M. Pompe

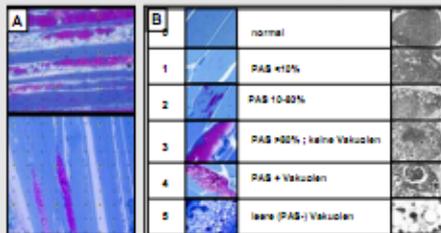
A. Schänzer¹, A.K. Pröhl¹, C. Mühlfeld², H. von Pein³, W. Paulus⁴, E. Mengel⁵, T. Marquardt⁶, A. Hahn⁷

¹Institut für Neuropathologie, JL Universität, Gießen; ²Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie, MHH Hannover; ³Abteilung für Neuropathologie, JGU Universität Mainz; ⁴Institut für Neuropathologie, UKM Münster; ⁵Villa Metabolica, JGU-Universität Mainz; ⁶Klinik für allgemeine Pädiatrie, UKM Münster; ⁷Abteilung für Neuropädiatrie JL Universität, Gießen

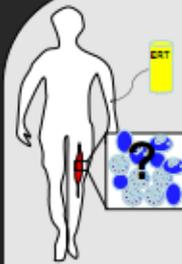
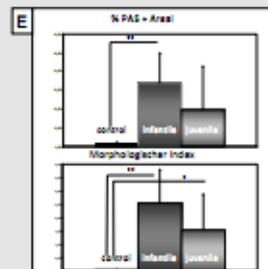
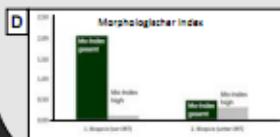
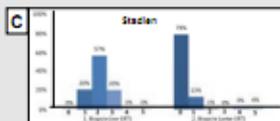
Einleitung: Bei Patienten mit Mb Pompe (Glykogenose Typ II) führt ein lysosomaler Enzymdefekt (saure α 1,4 Glukosidase) zu einer pathologischen Glykogenspeicherung und in der Skelettmuskulatur zeigt sich das Bild einer vakuolären Myopathie mit pathologischen Glykogenablagerungen. Bisher wurde das Ausmaß der morphologischen Veränderungen nicht näher klassifiziert. Das Ziel der Studie war es, eine genaue morphologische Klassifizierung an möglichst kleinen Muskelbiopsaten durchzuführen und die Ergebnisse mit dem Ansprechen der Kinder auf eine Enzymersatztherapie (ERT) zu korrelieren.



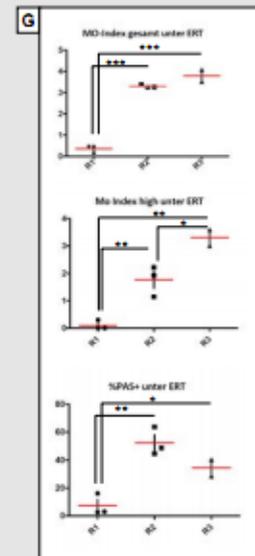
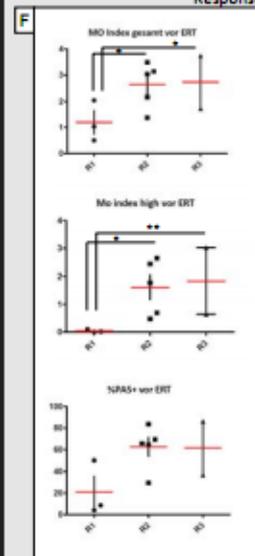
Material & Methoden: Muskelbiopsien von Patienten mit M. Pompe vor und unter (ERT) und Kontrollpatienten wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden untersucht. Das Ausmaß der PAS+ Ablagerungen wurde mit Hilfe eines Computer gestützten Stereologie System (new CAST) analysiert (A). Die morphologischen Veränderungen einzelner Muskelfasern wurden in morphologische Stadien (mod. nach Thurberg et al 2006) klassifiziert (B). Die Analyse wurde an PAS gefärbten Semidünnschnitten durchgeführt.



Aus den Gesamtwerten der in unterschiedlichen Stadien betroffenen Muskelfasern (C) wurde ein Morphologischer Index berechnet (D): MO-Index Gesamt (Stadien 0 bis 5) und Mo-Index high (Stadien 4+5) wobei ein niedriger Mo-Index geringe Veränderungen und ein hoher Mo-Index ausgeprägte Veränderungen anzeigt. Der Mo-Index zeigt im Vergleich zur Bestimmung der PAS+ Areale auch eine Signifikanz zwischen Kontrollpatienten und den juvenilen Fällen (E).



Ergebnisse: Seit vielen Jahren ist die ERT zugelassen. Doch das klinische Ansprechen der Kinder ist sehr unterschiedlich. In der Studie haben wir untersucht, ob die morphologischen Veränderungen mit dem klinischen Ansprechen korrelieren. Es wurden Muskelbiopsien vor Beginn der Therapie und unter Therapie untersucht. Vor Therapiebeginn war der Mo-Index bei Patienten mit gutem Ansprechen niedriger als bei solchen mit mittlerem und schlechtem Ansprechen ($p < 0.05$) (F). Unter ERT zeigten Patienten mit gutem Ansprechen einen niedrigeren Mo-Index als Kinder mit mittlerem oder schlechtem Ansprechen (p jeweils < 0.005) (G). Die PAS+ Ablagerungen korrelierten dagegen nur unter ERT signifikant mit dem Response



Klinisches Ansprechen (response):

R1=gut (Laufen möglich/ altersentsprechende Entwicklung)

R2=mittel (freies Sitzen möglich /deutliche Verbesserung)

R3=schlecht (freies Sitzen nicht möglich /keine Verbesserung)

Zusammenfassung: Die Studie gibt Hinweise darauf, dass morphologische Veränderungen nicht nur unter Therapie sondern auch in der initialen Muskelbiopsie vor Therapiebeginn (ERT) mit dem klinischen Ansprechen korrelieren. Die Muskelpathologie könnte daher als ein möglicher prädiktiver Marker genutzt werden. Die morphologischen Veränderungen können mit dem neu etablierten Mo-Index an Kunststoff eingebettetem Gewebe klassifiziert werden, welcher genauer ist als die Bestimmung der PAS+ Ablagerungen. Die in Kunststoff eingebetteten Gewebsteile haben den Vorteil, dass sie einfach in Rahmen von Studien an den Referenzneuropathologen verschickt werden können. Die erhobenen Daten sollten an einer größeren Patientengruppe validiert werden. Zusätzlich werden adulte Fälle in die Studie mit aufgenommen.

Literatur:

Thurberg BL et al. Characterization of pre- and post treatment pathology after enzyme replacement therapy for pompe disease. *Lab Invest* 2006

12.5 Einverständniserklärung der Patienten zur Untersuchung des Gewebes für wissenschaftliche Zwecke

Freigabe von Haut-, Muskel- und Nervenbiopsieproben zu Forschungszwecken

Liebe Eltern!

Bei Ihrem Kind soll eine Haut-, Nerven- oder Muskelbiopsie durchgeführt werden. Wir, die Ärzte der Abteilung für Neuropädiatrie und des Instituts für Neuropathologie, haben eine Bitte an Sie: Wir würden gerne eventuell anfallende Reste von Gewebeproben zu Forschungszwecken verwenden.

Genauer gesagt:

Zu den Aufgaben eines Universitätsklinikums zählt auch die Erforschung von Krankheiten und die Entwicklung neuer Untersuchungs- und Behandlungsmethoden. Oft ist dafür die Benutzung von überschüssigem organischem Material (z.B. Gewebereste nach Haut-, Nerven- oder Muskelbiopsie) eine wichtige Voraussetzung. Diese Materialien müssen normalerweise kostspielig entsorgt werden.

Sie können uns bei unserer Forschung sehr helfen, wenn Sie solches Material zur Forschung freigeben.

Ihre Einwilligung ist mit keinen persönlichen Vor- oder Nachteilen für ihr Kind verbunden. Sie ermöglicht jedoch den Gewinn neuer Erkenntnisse durch Forschung zum *Nutzen zukünftiger Patientinnen und Patienten*. Damit möglichst jeder Patient in den Genuss eines solchen Fortschritts kommen kann, veröffentlichen wir unsere Forschungsergebnisse vor allem in medizinischen Fachzeitschriften. Gelegentlich ist allerdings auch die kommerzielle Anwendung unserer Forschungsergebnisse durch die Industrie erforderlich, damit neue Medizingeräte, neue Arzneimittel u.s.w. überhaupt erst auf den Markt kommen können. Ob die Gewebespende Ihres Kindes hierzu beitragen kann, ist derzeit noch völlig ungewiss. Rein vorsorglich möchten wir Sie jedoch um Ihr Einverständnis auch mit einer solchen eventuellen kommerziellen Anwendung der mit Ihrer Hilfe erzielten Erkenntnisse bitten. Dieses Einverständnis schließt Ihren Verzicht auf jede Art von Entgelt ein und versteht sich als uneigennütziger Beitrag zur Förderung des medizinischen Fortschritts.

Wichtig ist: Entnommen wird *keinesfalls mehr Gewebe, als ohnehin erforderlich für die Untersuchung*. Sie überlassen uns nur die Gewebereste Ihres Kindes, die bei allen Untersuchungen natürlicherweise übrig bleiben. Wir versichern darüber hinaus, dass die Daten- und Persönlichkeitsrechte Ihres Kindes umfassend geschützt werden, insbesondere, dass jeder Bezug des Materials zu Ihrem Kind zum frühestmöglichen Zeitpunkt unkenntlich gemacht wird.

Für weitere Fragen zu Ort und Dauer der **Aufbewahrung**, zum hiermit verbundenen Datenschutz und zur geplanten Vernichtung des Materials stehen die Ärzte der Station Pfaundler oder Herr PD Dr. Hahn jederzeit zur Verfügung.

Wir bedanken uns für Ihre Hilfe!

.....
(Unterschrift des Abteilungsleiters oder seines Stellvertreters)

Einverständniserklärung	
Name des Kindes:	
Mit der beschriebenen Verwendung des bei meinem Kind entnommenen Gewebes bin ich	
<input type="checkbox"/> einverstanden	<input type="checkbox"/> nicht einverstanden.
Gießen, den
(Datum)	(Unterschrift Elternteil oder Sorgeberechtigter)

Stand: 14.07.2009

13 Publikationsverzeichnis

Morphological changes in muscle biopsies from patients with infantile and juvenile Pompe disease as a potential predictive marker for enzyme replacement therapy (ERT)

A.K. Pröhl, A. Hahn, C. Mühlfeld, H. von Pein, E. Mengel, A. Schänzer

57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie DGNN, Erlangen 2012 (siehe Poster 1 im Anhang)

Quantifizierung morphologischer Veränderungen im Muskelbiopsat bei Patienten mit infantiler und früh juveniler Verlaufsform eines M. Pompe

A. Schänzer, A.K. Pröhl, C. Mühlfeld, H. von Pein, W. Paulus, E. Mengel, T. Marquardt, A. Hahn

21. Kongress des Wissenschaftlichen Beirates der DGM, Aachen 2013 (siehe Poster 2 im Anhang)

The role of neuropathological investigations in lysosomal storage diseases

A. Schänzer, A. Hahn, C. Mühlfeld, H. von Pein, W. Paulus, E. Mengel, T. Marquardt, A.K. Pröhl

57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie DGNN, Erlangen 2012 (Vortrag Dr. A. Schänzer)

Quantifizierung morphologischer Veränderungen im Muskelbiopsat bei Patienten mit infantiler und früh-juveniler Verlaufsform eines M. Pompe

A. Schänzer, A.K. Pröhl, C. Mühlfeld, H. von Pein, W. Paulus, E. Mengel, T. Marquardt, A. Hahn

39. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie, Innsbruck 2013 (Vortrag Dr. A. Schänzer)

Quantifizierung morphologischer Veränderungen im Muskelbiopsat bei Patienten mit infantiler und früh-juveniler Verlaufsform eines M. Pompe

A. Schänzer, A.K. Pröhl, C. Mühlfeld, H. von Pein, W. Paulus, E. Mengel, T. Marquardt, A. Hahn

Neuropediatrics, April 2013, 44 (2), p. 85

14 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

15 Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Acker und Frau Dr. Schänzer für die Bereitstellung des Themas, die herausragende Betreuung und die Hilfestellung bei Problemen danken.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Neuropathologie, insbesondere Frau Dambmann und Frau Schmidt, die mir immer mit Rat und Tat im Labor zur Seite gestanden haben.

Ich danke Herrn Dr. Hahn für die Bereitstellung der Patientendaten und die Beratung bei klinischen Fragen.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Mühlfeld für die Anregungen und Hilfe bei der morphologischen Auswertung und der Statistik.

Dann möchte ich meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung, Hilfestellung jeglicher Art und Aufmunterung in schwierigen Zeiten danken.

Zuletzt danke ich meinem Mann für seine Geduld und seine Unterstützung in allen Lebenslagen, auch in den angespannten und schwierigen Momenten.

Danke!