

Über den histochemischen Leucin-Aminopeptidase-Nachweis in der menschlichen Skeletmuskulatur bei verschiedenen Myopathien

F. MITTELBACH und D. PONGRATZ

II. Medizinische Klinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. BODECHTEL.)

Eingegangen am 13. August 1968

Histochemical Evidence of Leucine Aminopeptidase Activity in Human Skeletal Muscle in Myopathies

Summary. With available histochemical methods, activity of leucine aminopeptidase is evident in human skeletal muscle only in those myopathies with proliferating connective tissue, not in normal muscle. In myopathy with proliferating connective tissue leucine aminopeptidase activity is only seen in the connective tissue, not however in the muscle fibre itself.

Zusammenfassung. Der histochemische Nachweis einer Leucin-Aminopeptidaseaktivität gelingt in der menschlichen Skeletmuskulatur nur dann, wenn es im Rahmen der verschiedensten pathologischen Prozesse zur Entwicklung eines proliferierenden oder entzündlich infiltrierten Bindegewebes kommt.

Im Muskelparenchym läßt sich in der Regel keine Leucin-Aminopeptidase-Aktivität nachweisen.

Die Tatsache, daß BOIS (1964) in der Muskulatur dystrophischer Mäuse, und hier vor allem in Bezirken mit vermehrter Bindegewebsentwicklung, eine erhöhte Leucin-Aminopeptidaseaktivität histochemisch und biochemisch nachweisen konnte, gab den Anlaß, an biotisch gewonnener menschlicher Skeletmuskulatur bei verschiedenen Muskelerkrankungen histochemische Untersuchungen zum Nachweis dieses Enzyms anzustellen.

Die als Exopeptidase zu klassifizierende Leucin-Aminopeptidase (LAP) greift Peptide an, die Leucin enthalten, und spaltet hier eine freie Aminogruppe ab. Für den histochemischen Nachweis stellen die Beta-Naphthylamide von freien oder acylierten Aminosäuren sehr gute Enzymsubstrate dar. Ihre Anwendung geht auf GOMORI (1954) zurück, der Glycin- und Alanin-Beta-Naphthylamid zur histochemischen Darstellung von Aminopeptidasen heranzog, während GREEN u. Mitarb. (1955) später für den äußerst empfindlichen Nachweis der Leucin-Aminopeptidase das L-Leucin-Beta-Naphthylamid einführten. Zur Sichtbarmachung der Reaktion wird mit Diazoniumsalzen die Entwicklung eines Azo-Farbstoffes erreicht. Hierzu hat sich am besten das Fast-Blue-B bewährt.

Das pH-Optimum für die histochemische Reaktion liegt, bedingt durch die gleichzeitige Azo-Kupplung, zwischen 6,5 und 7,1, während das Optimum der Aminopeptidaseaktivität nach Untersuchungen von SMITH und SPACKMAN (1955) zwischen pH 8 und 9 liegt. In eingehenden biochemischen Analysen konnten SYLVÉN und BOIS (1962/63) zeigen, daß bei Anwendung der Reaktion am Skeletmuskel eine im Vergleich mit anderen Organen nur sehr geringe LAP-Aktivität

zu verzeichnen war, wobei an dem positiven Resultat auch in Spuren eine Prolinase und eine metallabhängige Gruppe von Enzymen beteiligt war. Histochemisch war am normalen Skelettmuskel erst nach einer partiellen Autolyse eine schwach positive Reaktion zu erzielen. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von OGATA und MORT (1963), denen am frischen Kryostatschnitt der menschlichen Muskulatur kein histochemischer LAP-Nachweis gelang.

Unter physiologischen Bedingungen gelingt beim Menschen die histochemische LAP-Reaktion vor allem in Speicheldrüse und Schweißdrüsen, im Magen-Darmtrakt, im Pankreas, in der Niere, im Ovar, im Endometrium, in der roten Pulpa der Milz, in der Epidermis und in den neutrophilen Granulocyten (ADACHI und MONTAGNA, 1967; BURSTONE und FOLK, 1956; GLENNER, BURSTONE und MEYER, 1959; CRAWFORD und SELIGMAN; ROSENHOTZ und WATTENBERG, 1961).

Daneben aber findet sich eine positive LAP-Reaktion auch bei einer Reihe von neoplastischen, entzündlichen und mit Bindegewebsproliferation einhergehenden Prozessen (MONIS, NACHLAS und SELIGMAN, 1958; BRAUN-FALCO, 1957; BURSTONE, 1956). Sie scheint unter diesen Bedingungen an eine besonders hohe proteolytische Aktivität eines entzündlichen oder tumorös infiltrativen Prozesses oder insbesondere an eine beginnende Bindegewebsentwicklung mit Fibroblasteneinwanderung gekoppelt zu sein.

Unsere Untersuchungen am Muskel richteten sich somit insbesondere darauf, ob im Rahmen von Muskelaffektionen, die mit Entzündung oder Bindegewebsentwicklung einhergehen, durch die histochemische LAP-Reaktion zusätzliche Aussagemöglichkeiten zu erzielen sind.

Methodik¹

Es wurde bioptisch gewonnene Skelettmuskulatur von folgenden Muskelkrankheiten untersucht:

1. Dystrophia musculorum progressiva.
2. Entzündliche Muskelaffektionen (Polymyositis, Herdmyositis).
3. Muskelaffektionen im Sinne einer neurogenen Atrophie.

Das Gewebe wurde unmittelbar nach der Entnahme durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend in der Tiefkühltruhe bei minus 60° C aufbewahrt. An den im Kryostaten angefertigten Schnitten von 10 μ Dicke wurde der *Leucin-Aminopeptidase-Nachweis* nach der Methode von NACHLAS, CRAWFORD und SELIGMAN (1957) mit L-Leucyl-Beta-Naphthylamid als Substrat und Fast-Blue-B als Diazoniumsalz bei einer Inkubationszeit von 2 Std bei 37° C durchgeführt.

Als Vergleichsuntersuchung wurde jeweils versucht, die *unspezifischen Esterasen* mit Bromindoxyacetat nach der Methode von HOLT und WITHERS bei einer Inkubationszeit von 2 Std bei 37° C nachzuweisen.

Ergebnisse

Ein Nachweis der LAP gelang in allen untersuchten Fällen fast nie in den Muskelfasern selbst, sondern nur im Bereich des Bindegewebes.

Bei der *progressiven Muskeldystrophie* fiel die histochemische Reaktion um so stärker aus, je mehr der bindegewebige Umbau des Muskels fortgeschritten war, oder je deutlicher das Bild von „entzündlichen“ Abräumreaktionen begleitet war. Abb. 1 zeigt einen dystrophischen Muskel mit erheblichem myosklerotischem

¹ Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Friedrich Baur-Stiftung, München, und der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

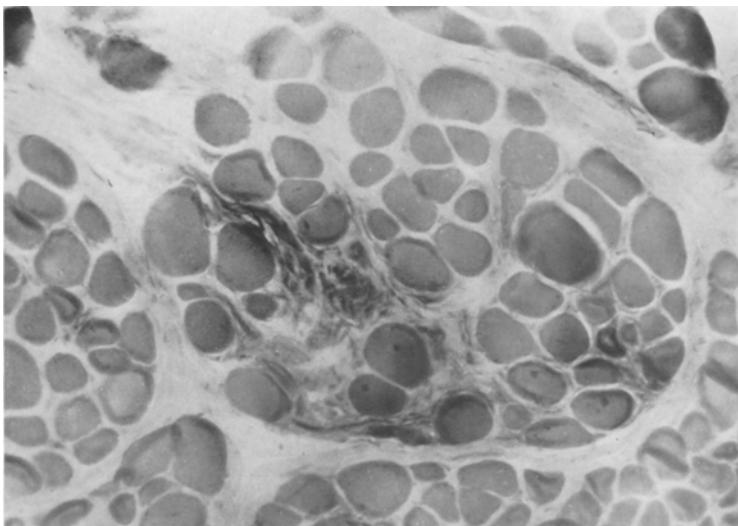


Abb. 1. Progressive Muskeldystrophie mit hoher LAP-Aktivität an Stellen mit bindegewebiger Proliferation im Skelettmuskel. LAP-Nachweis mit L-Leucin-Beta-Naphthylamid + Fast-Blue-B, Vergr. 100×

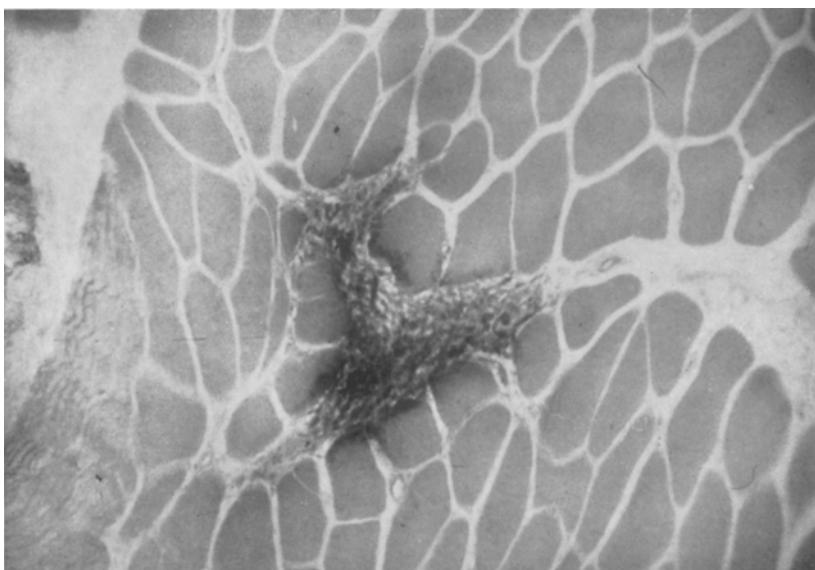


Abb. 2. Granulomatöse Myositis bei Sarkoidose; LAP-Nachweis mit L-Leucin-Beta-Naphthylamid + Fast-Blue-B, Vergr. 100×

Umbau und unterschiedlichen Faserkalibern. Der LAP-Nachweis findet sich vor allem in den breiten Bindegewebssepten, wobei fleckigsträhnige Strukturen zur Darstellung kommen.

Bei den *entzündlichen Prozessen* zeigte sich im Bereich der Infiltrate eine positive Reaktion. Abb. 2 beweist dies bei einer Herdmyositis im Rahmen eines Morbus Boeck. Hier kommt es nicht nur zum Nachweis einer Aktivität im fein-

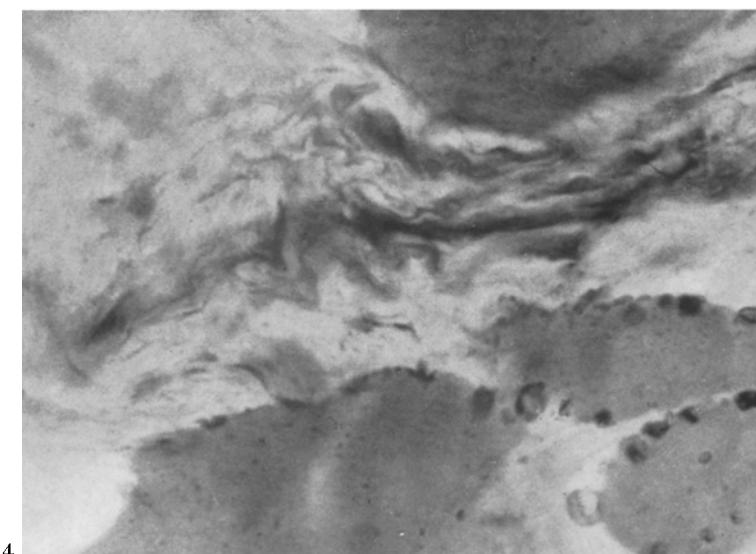
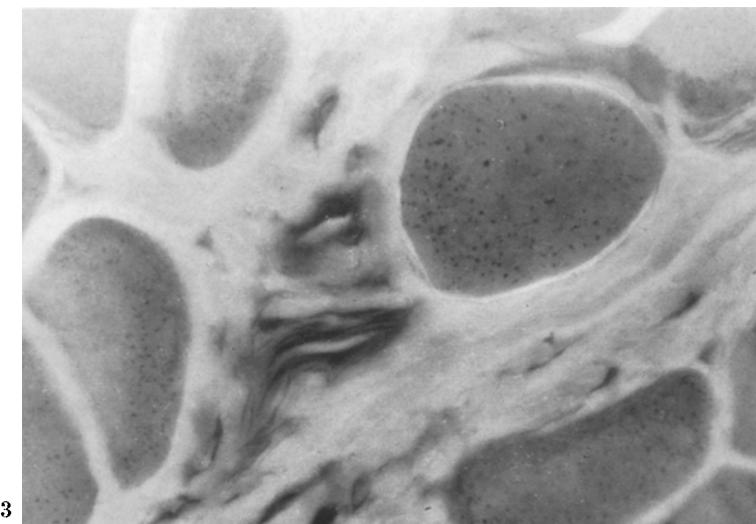


Abb. 3 u. 4. Progressive Muskeldystrophie; LAP-Nachweis mit L-Leucin-Beta-Naphthylamid + Fast-Blue-B. In Abb. 3 feinkörniger Niederschlag des Azofarbstoffes innerhalb der Faser. In Abb. 4 grobe Anfärbungen am Rande der Fasern. Vergr. 450×

netzigen Bindegewebe, sondern teilweise auch in den Zellen des entzündlichen Infiltrates selbst.

Auch bei der *fortgeschrittenen Denervationsatrophie* findet man im Bindegewebe eine deutliche Aktivität der LAP. Bei einer frischen neurogenen Atrophie dagegen fällt die Reaktion genauso, wie am normalen Muskel, negativ aus. Nur in ganz wenigen Fällen, wo einzelne Fasern dicht von infiltrierendem Bindegewebe eingescheidet waren und sich auch im histologischen Präparat im Faserinneren

zumindest teilweise nekrotische Veränderungen nachweisen ließen, zeigte sich gelegentlich auch dort eine positive LAP-Reaktion. Ob es sich hierbei um eine wirklich faserständige Enzymaktivität in zugrunde gehenden Muskelfasern im Rahmen einer Proteolyse handelt oder nur um Diffusionsartefakte aus dem umgebenden Bindegewebe, erscheint zumindest problematisch.

In einigen Fällen zeichnen sich im Faserinneren klar abgrenzbare, fein verteilte Niederschläge des Azo-Farbstoffes ab (Abb. 3), von denen man nicht ohne weiteres annehmen kann, daß es sich um Artefakte handelt, in vielen anderen Fällen aber zeigen sich nur am Faserrande in der Nähe eines deutlich LAP-positiven Bindegewebes grobkörnige, konfluierende Anfärbungen, deren Klassifizierung als Diffusionsartefakte mit wesentlich größerer Sicherheit getroffen werden kann (Abb. 4).

In keinem der untersuchten Präparate konnte mit der Methode nach HOLT und WITHERS (1958) unter Verwendung von Bromindoxyacetat der Nachweis von unspezifischen Esterasen erbracht werden. Dadurch wird die Spezifität des LAP-Nachweises unterstrichen.

Diskussion

In vorliegenden Untersuchungen läßt sich in der menschlichen Skelettmuskulatur nur im Bereich eines proliferierenden oder entzündlich infiltrierten Bindegewebes eine positive LAP-Reaktion nachweisen. Bei genauerer Analyse erscheinen vor allem die Fibroblasten, die neutrophilen Granulocyten und Histiocyten die für den positiven Ausfall der Reaktion verantwortlichen Zellelemente zu sein. Im intakten Muskelparenchym, das auch in biochemischen Analysen von Homogenaten nur relativ wenig LAP enthält, erreicht man auch beim Angebot des geeigneten Enzymsubstrates histochemisch keine nachweisbare Reaktion. Inwieweit das Enzym normalerweise in inaktiver oder topochemisch gebundener Form vorliegt und erst beim Einsetzen einer Faserproteolyse in eine reagible Form übergeführt wird, muß hypothetisch bleiben.

Jedenfalls stellt der positive Ausfall der LAP-Reaktion in keiner Weise ein spezifisches Kriterium für die Dystrophia musculorum progressiva dar. Das histopathologische Bild dieser Erkrankung ist insgesamt sehr uneinheitlich und geht in mehr oder minder starkem Maße mit Bindegewebsproliferation oder aber mit sekundär entzündlichen Zeichen und cellulären Abräumphänomenen einher. Sicher ist die Ansicht von BOURNÉ und GOLARZ (1959), daß die primäre pathogenetische Störung bei der Muskeldystrophie im Bindegewebe zu suchen sei, zu einseitig. Viel eher könnte die Bindegewebsproliferation bei vielen Formen dieser Erkrankung als Versuch zu deuten sein, den Abstrom von Muskelproteinen aus den Fasern einzudämmen. Inwieweit der zunehmende LAP-Aktivität, die vermutlich in den Abbau dieser Proteine eingreift, insofern eine pathogenetische Bedeutung zukommt, als durch den Abbau von L-Polypeptiden antigen und immunogen wirksame Stoffe entstehen, die schließlich zum Auftreten der zellfixierten Antikörper gegen Muskeleiweiß führen, bleibt weiteren Untersuchungen überlassen. Jedenfalls könnte diese Hypothese durch Allergiestudien von DE WECK bei Hautkrankheiten eine Stütze finden, wo sich nämlich ergab, daß bei künstlichen Polypeptiden als Antigene nur L-Polypeptide wirksam sind, die

nur bei Anwesenheit einer L-Peptidase entstehen können. Über die von uns angestellten Untersuchungen bezüglich zellgebundener Antikörper bei verschiedenen Myopathien wird an anderer Stelle berichtet werden.

Literatur

ADACHI, K., and W. MONTAGNA: Histology and cytochemistry of human skin. XXII. Sites of leucine aminopeptidase. *J. invest. Derm.* **37**, 145—147 (1961).

BOIS, P.: Leucin aminopeptidase activity in muscles of dystrophic mice. *Experientia (Basel)* **20**, 140—141 (1964).

BOURNE, G. H., and M. N. GOLAREZ: Human muscular dystrophy as an aberration of the connective tissue. *Nature (Lond.)* **183**, 1741—1743 (1959).

BRAUN-FALCO, O.: Histochemical demonstration of aminopeptidase in normal and pathological skin. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 94 (1957).

BURSTONE, M. S.: Histochemical demonstration of proteolytic activity in human neoplasms. *J. nat. Cancer Inst.* **16**, 1149—1169 (1956).

GLENNER, G. G., M. S. BURSTONE, and D. B. MEYER: A study of aminopeptidase activity in the stroma of neoplastic tissue with a comparison of histochemical technique. *J. nat. Cancer Inst.* **23**, 857—872 (1959).

GOMORI, G.: Chromogenic substrates for aminopeptidase. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N. Y.)* **87**, 559—561 (1954).

GREEN, M. N., K. C. TSOU, R. BRESSLER, and A. M. SELIGMAN: The colorimetric determination of leucine aminopeptidase activity with L-leucyl-beta-naphthylamide hydrochloride. *Arch. Biochem.* **57**, 458—474 (1955).

HOLT, S. J., and R. F. J. WITHERS: Studies in enzyme cytochemistry. V. An appraisal of indogogenic reactions for esterase localization. *Proc. roy. Soc. B* **148**, 520—531 (1958).

MONIS, B., M. M. NACHLAS, and A. M. SELIGMAN: Histochemical observations on leucine aminopeptidase activity in diseased tissues. Proceed. 9th Annual Meeting *Histochem. Soc.* Apr. 13—14, 1958. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 395 (1958).

NACHLAS, M. M., D. T. CRAWFORD, and A. M. SELIGMAN: The histochemical demonstration of leucine aminopeptidase. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 264—278 (1957).

OGATA, T., and M. MORI: A histochemical study of hydrolytic enzymes in muscle fibers of various animals. *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 645—652 (1963).

ROSENHOTZ, M., and L. W. WATTENBERG: Morphologic histochemical aminopeptidase. *Arch. Path.* **71**, , 63—75 (1961).

SMITH, E. L., and D. H. SPACKMAN: Leucine aminopeptidase V. Activation, specificity and mechanism of action. *J. biol. Chem.* **212**, 271—299 (1955).

SYLVEÅN, B., and I. BOIS: Studies on the histochemical "leucinaminopeptidase" reaction. I. Identity of the enzymes possibly involved. II. Chemical and histochemical comparison of the enzymatic and environmental factors involved. *Histochemie* **3**, 65—78, 341—353 (1962/63).

WECK, A. L. DE: Was ist ein Antigen? *Dtsch. med. Wschr.* **92**, 122—126 (1967).

Priv.-Doz. Dr. F. MITTELBACH
II. Med. Klinik der Universität München
8 München 15, Ziemssenstraße 1