

Aus der
Muscle Research Unit mit Hochschulambulanz für Muskelerkrankungen
Experimental and Clinical Research Center (ECRC)
Eine Kooperation der Charité - Universitätsmedizin Berlin und des
Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin in der Helmholtz Gesellschaft

DISSERTATION

Proteinfehlfaltung als Ursache der Muskeldystrophie Dysferlinopathie:

Das Mausmodell Dysf-MMex38

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Leonie Victoria Heidt

aus Berlin

Datum der Promotion: 7.12.2018

Vorwort

Leonie Victoria Heidt hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

„Exon skipping in a *Dysf*-missense mutant mouse model“

Autoren:

Jakub Malcher †, Leonie Heidt †, Aurélie Goyenvalle, Helena Escobar, Andreas Marg, Cyriaque Beley, Rachid Benchaouir, Michael Bader, Simone Spuler, Luis García*, Verena Schöwel*

† Geteilte Erstautorenschaft

* Geteilte Letztautorenschaft

Zeitschrift:

Molecular Therapy Nucleic Acids

Erscheinungsjahr:

2018

Beitrag im Einzelnen:

In der oben genannten wissenschaftlichen Arbeit werden aus dieser Dissertation die Charakterisierungsversuche des Mausmodells MMex38 (Western Blot, Histologie, Ausdauerleistung, Membranreparatur nach Laserschädigung, Amyloidablagerungen) veröffentlicht. Diese sind insbesondere in Abbildung 1: "*Characteristics of the new animal model Dysf-MMex38*" und Abbildung 2: "*Further histopathological characterization of MMex38*" dargestellt.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract.....	4
1.1	Deutsch	4
1.2	English	5
2	Einleitung	7
2.1	Gliedergürtelmuskeldystrophien.....	7
2.2	Dysferlinopathie	8
2.2.1	Dysferlin.....	8
2.2.2	Genetik	10
2.2.3	Pathophysiologie	10
2.2.4	Klinisches Bild	12
2.2.5	Diagnostik.....	13
2.2.6	Therapeutisches Regime.....	14
2.2.7	Therapieansätze in der Forschung.....	14
2.3	Bedeutung und Ablauf von Tierversuchen	22
2.4	Forschung zu seltenen Erkrankungen	24
3	Material	26
4	Methoden.....	30
4.1	Versuchstiere	30
4.1.1	Tierhaltung.....	30
4.1.2	Genotypisierung	30
4.2	Probengewinnung	32
4.3	Western Blot.....	32
4.4	Antikörper-Färbung	33
4.5	Ausdauerterst mit dem Laufband	34
4.6	Histologie	35
4.6.1	Biopsie Aufarbeitung	35
4.6.2	Schnitte.....	35
4.6.3	Färbungen	35
4.6.4	Mikroskopische Auswertung.....	37
4.7	Messung der Körperzusammensetzung	37
4.8	Membranreparatur nach Laserschädigung der Muskelmembran	38
4.9	Ketogene Diät	39

4.9.1	Zusammensetzung der Nahrung	40
4.10	Statistik.....	42
5	Ergebnisse.....	43
5.1	Untersuchungsgruppen.....	43
5.2	Western Blot.....	44
5.3	Antikörper-Färbung	44
5.4	Ausdauerterst mit dem Laufband	45
5.5	Histologie	48
5.5.1	Gomori Trichrom-Färbung	48
5.5.2	Kongorot-Färbung	51
5.5.3	Öl-Rot-Färbung.....	52
5.5.4	Faserdurchmesser.....	53
5.6	Messung der Körperzusammensetzung	56
5.7	Membranreparatur nach Laserschädigung der Muskelmembran	59
5.8	Ketogene Diät	62
5.8.1	Ausdauerterst mit dem Laufband.....	63
5.8.2	Histologie.....	65
5.8.3	Messung der Körperzusammensetzung.....	69
6	Diskussion	73
6.1	Diskussion der Methoden.....	73
6.1.1	Funktionelle Tests	73
6.1.2	Histologische Tests	78
6.1.3	Ketogene Diät.....	79
6.2	Diskussion der Ergebnisse.....	81
6.2.1	Das MMex38-Mausmodell.....	81
6.2.2	Funktionelle Tests	82
6.2.3	Proteinanalyse.....	83
6.2.4	Histologische Tests	84
6.2.5	Ketogene Diät.....	87
6.3	Tierversuche in der Wirkstoffentwicklung.....	88
6.4	Schlussfolgerung.....	90
7	Literaturverzeichnis.....	92
8	Eidesstattliche Versicherung	107
9	Lebenslauf	108

10 Danksagung..... 109

1 Abstract

1.1 Deutsch

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung des neu generierten MMex38-Mausmodells. Dieses stellt das erste Tiermodell für die Gliedergürtelmuskeldystrophie Dysferlinopathie dar, bei der die Erkrankung durch eine Missense-Mutation und Proteinfehlfaltung hervorgerufen wird.

Die Dysferlinopathie ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Muskelkrankheit. Ein Drittel aller krankheitsverursachenden Mutationen sind Missense-Mutationen. Durch Punktmutation im Dysferlingen (*DYSF*) und konsekutiver Proteinfehlfaltung kommt es zur intrazellulären Proteinaggregation, vorzeitigem Proteinabbau und Funktionsverlust des Proteins. Derzeit existiert kein kausaler Therapieansatz. Durch die Behandlung dysferlindefizienter primärer, humaner Myotuben mit kurzen Dysferlinpeptiden, konnte das endogene, fehlgefaltete Dysferlin an die Muskelzellmembran relokalisiert werden und seine Funktion als Membranreparaturprotein wiederaufnehmen. Es wurde ein *knock-in*-Mausmodell mit einer Punktmutation in Exon 38 generiert (*Dysf* p.L1360P; analog zur humanen Mutation *DYSF* p.L134P) um den oben genannten Therapieansatz *in vivo* zu testen. Muskelhistologie- und Physiologie wurden in zwölf, zwanzig und sechzig Wochen alten Mäusen untersucht.

Unsere aktuellen Daten weisen auf eine Beeinträchtigung der Glykolyse im dysferlindefizienten Muskel hin. Daher wurde der Einfluss einer ketogenen Diät auf den Krankheitsverlauf in MMex38- und Wildtyp-Versuchstieren getestet.

Die Proteinexpression war in MMex38-Muskeln essentiell reduziert und am Sarkolemm konnte kein Dysferlin nachgewiesen werden. Das Gesamtkörpergewicht war in zwanzig Wochen alten MMex38-Mäusen erhöht, wohingegen die fettfreie Masse reduziert war. Die Muskelmasse einzelner Muskeln war erniedrigt. Histologisch konnten Muskeldystrophie in Form von nekrotischen Fasern, regenerierenden Fasern, zentralisierten Zellkernen und entzündlichen Veränderungen sowie Amyloidablagerungen nachgewiesen werden. Histopathologische Veränderungen waren bereits mit zwölf Wochen nachweisbar und mit dem Alter zunehmend. Dreiwöchige Laufbandbelastung führte zu einer signifikanten Beeinträchtigung der

Ausdauerleistung ab einem Alter von zwanzig Wochen. Die Beurteilung der Muskelmembranreparatur zeigte eine verzögerte Membranversiegelung nach Schädigung.

Eine ketogene Ernährung konnte in zwanzig Wochen alten MMex38-Mäusen eine Verbesserung der Ausdauerleistung induzieren. Histologisch zeigten sich eine Zunahme der nekrotischen Fasern sowie leichte Faseratrophie im M. quadriceps und eine Abnahme der Fasern mit zentralisierten Zellkern im M. tibialis anterior.

Es wurde belegt, dass die Generierung eines dysferlindefizienten Mausmodells mit Proteinfehlfaltung für die Dysferlinopathie erfolgreich war. Die Mutation führte analog zu den humanen krankheitsspezifischen Veränderungen im Tiermodell zu den erwarteten pathologischen Charakteristika der Proteinfehlfaltung. Die Progredienz der Erkrankung konnte durch signifikant steigende Parameter dargestellt werden. Dieses Mausmodell eignet sich daher für weitere therapeutische *in vivo* Studien unter Beachtung verschiedener pathophysiologischer Parameter.

Die Ernährungsintervention führte zu messbaren Veränderungen in der Krankheitsprogression. Der Einfluss einer ketogenen Diät auf die Dysferlinopathie konnte dabei nicht eindeutig geklärt werden. Sollten klinische Studien diesbezüglich erwogen werden, ist zunächst eine kurzfristige, medizinisch betreute Ernährungsumstellung voranzustellen, um unerwünschte Effekte frühzeitig zu detektieren.

1.2 English

The aim of this thesis was the characterization of the newly generated MMex38- mouse model. It is the first animal model for the limb girdle muscular dystrophy dysferlinopathy, which is caused by a missense mutation and protein misfolding.

Dysferlinopathy is a rare autosomal recessive muscle disease. One third of all disease-causing mutations are missense mutations. Point mutation in the dysferlin gene (*DYSF*) and consecutive protein misfolding results in intracellular protein aggregation, premature protein degradation and loss of functional protein. There is no therapy. It could be shown that by treating primary human myotubes with short dysferlin peptides, endogenous misfolded dysferlin relocated to the sarcolemma where it regained its proper function as a membrane repair protein.

A knock-in mouse with a missense mutation in exon 38 (*Dysf* p.L1360P, analogous to the human mutation *DYSF* p.L1341P) was generated to test this approach *in vivo*. Muscle physiology and histology were characterized at twelve, twenty and sixty weeks of age.

Due to the assumption of impaired glycolysis in dysferlin-deficient muscles, the effects of a ketogenic diet on the disease progression was tested in MMex38-mice and wild type controls.

Protein expression was substantially reduced in MMex38 skeletal muscle and sarcolemmal dysferlin was absent. Total body weight of 20-week-old MMex38 was increased with reduced percentage of lean tissue. Single muscle mass was decreased. Histology revealed muscular dystrophy with necrotic fibers, regenerating fibers and inflammation. Amyloid formation could be found in MMex38-muscle. The changes were prominent in twelve-week-old MMex38 and worsened with age. Three weeks of treadmill exercise exposed significant endurance impairment in 20-week-old MMex38. The membrane-wounding assay demonstrated delayed membrane resealing.

A ketogenic diet induced an improvement of running distance in 20-week-old-MMex38. Muscle histology showed fiber atrophy and increase of necrotic fibers in the quadriceps muscle and reduced fibers with centralized nuclei in the tibialis anterior muscle.

The targeted mutation induced all characteristics of protein misfolding in dysferlinopathy in analogy to the human disease course. The continuous disease progression in adulthood could be monitored by statistically significant changing parameters. The successful generation of an animal model for protein misfolding in this muscular dystrophy can be taken into consideration and allow for further preclinical therapeutic trials.

The ketogenic diet led to measurable changing parameters, however the effects of the diet could not be definitely revealed. Therefore testing the diet in patients for a shorter time period and under medical guidance should be performed prior to clinical studies.

2 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung eines neuen Mausmodells für die Muskeldystrophie „Dysferlinopathie“. Die im neuen Mausmodell transgen eingeführte Genveränderung entspricht einer in einer größeren Patientengruppe krankheitsverursachende Punktmutation. Die Dysferlinopathie gehört zu der Gruppe der seltenen Erkrankungen und ist derzeit nicht therapierbar. Ziel dieser Arbeit ist es, den Krankheitsverlauf im neuen Mausmodell zu charakterisieren und die murine Pathologie mit der im Menschen zu vergleichen. Letztlich wird geprüft, ob das neue Mausmodell für präklinische therapeutische Interventionsstudien eingesetzt werden kann. Zur Charakterisierung wurde die Muskulatur der Tiere durch verschiedene Verfahren sowohl auf ihre Funktionalität als auch auf die histologische Morphologie untersucht. Im Anschluss daran wurde eine erstmalige Interventionsstudie im neuen Tiermodell durchgeführt. Untersucht wurden die physiologischen und morphologischen Auswirkungen durch eine ketogene Ernährungsintervention im Mausmodell für die Dysferlinopathie. Geprüft wurde, ob sich durch die Intervention Veränderungen in der Krankheitsprogression messen lassen und welche Auswirkungen eine entsprechende Ernährungsumstellung bei Vorliegen einer Dysferlinopathie hervorgerufen durch eine Missense-Mutation hat.

2.1 Gliedergürtelmuskeldystrophien

Gliedergürtelmuskeldystrophien bezeichnet eine heterogene Gruppe von Muskelerkrankungen, bei denen es zu einer progressiven Muskelschwäche des Becken- und Schultergürtels und der Extremitäten kommt. Eine Vielzahl von Proteinen kann betroffen sein. Je nach Erkrankung treten die ersten Symptome bereits bei Geburt, im frühen Kindesalter oder erst im späteren Erwachsenenalter auf. Allen Muskeldystrophien ist ein progredienter Krankheitsverlauf gemeinsam. Die abnehmende Kraft, die schwindende Mobilität und der Verlust der Selbstständigkeit schränken die Patienten in der Teilnahme am täglichen Leben erheblich ein. Die Gliedergürtelmuskeldystrophien werden entsprechend des Vererbungsmodus in zwei Gruppen untergliedert. Die Gliedergürtelmuskeldystrophien der Gruppe 1 werden autosomal-dominant vererbt. Anhand des betroffenen Gens werden die acht Subtypen

(1A-H) definiert. Analog werden Gliedergürtelmuskeldystrophien der Gruppe 2 in derzeit 24 (2A-X) bekannte, autosomal-rezessiv vererbte Subtypen unterteilt (1). Eine von ihnen ist die Dysferlinopathie. Aktuell ist für keine der Gliedergürtelmuskeldystrophien eine kausale Therapie zugelassen.

2.2 Dysferlinopathie

Die Dysferlinopathie ist eine hereditäre Muskelerkrankung, die durch eine genetische Mutation im Dysferlingen ausgelöst wird. Die autosomal rezessiv vererbte Mutation führt zu zwei verschiedenen Hauptausprägungsformen: der Gliedergürtelmuskeldystrophie 2B (engl.: limb girdle muscular dystrophy 2B = LGMD2B) und der Miyoshi Myopathie (MM). Eine seltenere Erscheinungsform ist die Distale Anteriore Myopathie (DAM). 1994 wurde in zwei Familien, unterschiedlicher ethnischer Herkunft, in denen Gliedermuskeldystrophien auftraten, eine Mutation auf Chromosom 2p13 gefunden. Dadurch konnte die LGMD2B erstmals beschrieben werden (2). Im darauffolgenden Jahr wurde entdeckt, dass Mutationen, die zur MM führen, im gleichen genetischen Locus zu finden sind (3). 1998 konnte das betroffene Dysferlingen identifiziert werden. Es wurden sowohl Familien mit MM (4) als auch mit LGMD2B (5) beschrieben, die in diesem Genlocus Mutationen aufweisen. Die exakte Prävalenz der Dysferlinopathie ist nicht bekannt. Es scheinen jedoch regionale Unterschiede zu bestehen. Die Erstbeschreibung der MM erfolgte in Japan (6). Des Weiteren wurden genetische Abweichungen für die Population der libyschen Juden (5, 7), sowie in der spanischen (8) und italienischen (9) Bevölkerung gefunden.

2.2.1 Dysferlin

Das Protein Dysferlin ist ein Typ-2-Transmembranprotein, das zu der Familie der Ferline gehört. Diese Proteine zeigen Ähnlichkeit mit dem *Caenorhabditis elegans* Spermatogenese-Faktor *fer-1*, welcher in Spermatozoiden für die Fusion von Vesikeln und der Plasmamembran zuständig ist (10). Die Funktion der Ferline beinhaltet darüber hinaus den intrazellulären Transport und die Membranreparatur (11). Dysferlin besteht aus sieben kalziumbindenden C2-Domänen mit variabler Affinität zu Kalzium und verschiedenen Phospholipiden (12). Die Größe des Proteins beträgt ungefähr 237 kDa.

Es ist in Muskelzellen vor allem in der Membran lokalisiert und kann darüber hinaus in subsarkolemmalen Vesikeln nachgewiesen werden (5).

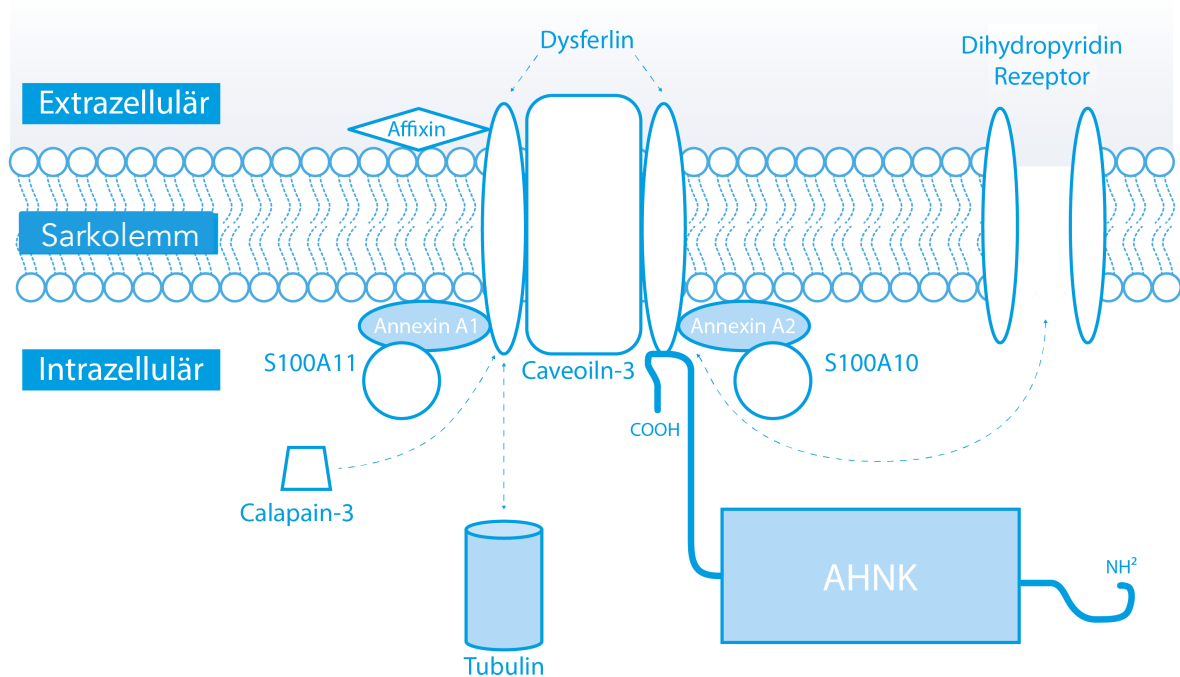


Abb. 1: Die Lokalisation und Interaktion von Dysferlin an der Muskelfasermembran, Eigene Darstellung nach Kobayashi et al. (13).

Weitere Studien weisen darauf hin, dass eine Assoziation von Dysferlin mit dem T-Tubulus-System besteht und Dysferlin damit an der Kalziumhomöostase der Muskelzelle beteiligt ist (14). Dysferlin kommt auch in anderen Geweben wie Leber, Lunge, Nieren, Herz und in Monozyten vor. Zur Beteiligung anderer Organsysteme im Falle einer Mutation des Dysferlins kommt es dennoch nur selten. Durch alltägliche Bewegungen wirken Kräfte auf die Skelettmuskelzellen ein, die regelmäßig zu sogenannten Mikrotraumen der Muskelmembran führen. Um diese Membranläsionen zu schließen, muss ein komplexer Membranreparaturprozess ablaufen (15).

Es konnte gezeigt werden, dass Dysferlin bei der kalziumabhängigen Reparatur dieser Verletzungen durch die Fusion zytoplasmatischer Vesikel in Zusammenarbeit mit weiteren Membranproteinen wie z.B. Caveolin-3, Calpain, Annexin, AHNK etc. eine bedeutende Rolle spielt (16).

2.2.2 Genetik

Das Dysferlin (*DYSF*) liegt auf Chromosom 2p13 und umfasst 55 Exone. Mutationen im Dysferlin führen zur Muskeldystrophie Dysferlinopathie. Die Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt. Es sind über 1000 unterschiedliche Mutationen beschrieben worden, die an jedem Locus entlang des Dysferlins auftreten können und zur Ausbildung einer Dysferlindefizienz führen (17, 18). Es kann keine Genotyp-Phänotyp-Korrelation beobachtet werden; selbst innerhalb einer Familie gibt es deutliche Unterschiede in der Ausprägung der Erkrankung (9). Etwa ein Drittel der Mutationen sind Punktmutationen, die zum Austausch einer einzelnen Aminosäure führen (19).

2.2.3 Pathophysiologie

Im Falle einer Punktmutation kommt es aufgrund der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der verschiedenen Aminosäuren zu einer Fehlfaltung des transkribierten Proteins. Das fehlgefaltete Dysferlin aggregiert intrazellulär und wird nicht an die Muskelzellmembran transportiert. Stattdessen kommt es zum protrahierten Abbau des Proteins, wodurch verringerte Dysferlinmengen in betroffenen Muskelfasern nachgewiesen werden (20, 21). Die Muskelmembran ist bei Patienten mit Dysferlinopathie primär organisatorisch stabil. Erst mit Progredienz der Erkrankung zeigen sich Plasmamembrandefekte, die zu Funktionseinschränkungen der Muskelfasern führen (22). Dysferlin bindet im gesunden Muskel die Annexine A1 und A2 (23). Annexine binden Kalzium und Phospholipide und sind bedeutend für den Membrantransport, für die Aktivität von Kanälen und für die Zell-Matrix-Interaktion. Des Weiteren können speziell Annexin A1 und A2 intrazelluläre Vesikel und Lipide an der zytoplasmatischen Membran aggregieren. Die Bindung von Dysferlin und Annexinen ist bei der Dysferlinopathie nicht gegeben, wodurch eine funktionierende Membranreparatur nicht möglich scheint (24). Im Falle einer Membranschädigung kommt es zum schnellen Einstrom von Kalzium nach intrazellulär. Durch die steigende intrazelluläre Kalziumkonzentration wird im gesunden Muskel eine Kaskade ausgelöst, die eine Vesikelaggregation bewirkt. Hieraus soll sich ein sogenannter Patch bilden, der mit der Zellmembran verschmilzt und somit die Integrität des Sarkolemms wieder herstellt (25). Neue Erkenntnisse weisen darauf hin, dass es bei Membranschädigung ebenfalls zu einer Rekrutierung von membranständigem Dysferlin kommt, wodurch eine

Zone an der Membran mit hoher lipidbindender Aktivität entsteht und somit die Fusion mit Reparaturvesikeln erleichtert und die Membranheilung ermöglicht wird (26). Im dysferlindefizienten Muskel ist das endogene fehlgefaltete Dysferlin zytoplasmatisch akkumuliert und nicht an der Membran lokalisiert (27). Daher bildet sich keine solche Zone aus und die Membranreparatur ist beeinträchtigt.

Die Aggregation des Dysferlins am Endoplasmatischen Retikulum (ER) führt darüber hinaus zu einer intrazellulären Signalkaskade, wodurch es zur ER-Stress-induzierten Apoptose der Zelle kommt (20). Es hat sich gezeigt, dass insbesondere Typ-II-Muskelfasern bei der Dysferlinopathie atrophisch sind (28, 29). Die Dysferlinopathie ist des Weiteren die erste Muskeldystrophie, bei der interzelluläre dysferlinhaltige Amyloid-Ablagerungen nachgewiesen werden konnten (30). Durch die beschriebenen intrazellulären Veränderungen kommt es zu Entzündungen und Einwanderung von Immunzellen in das Muskelgewebe (31). Ein morphologisches Merkmal dysferlindefizienter Muskelfasern sind demnach histologisch sichtbare Entzündungsreaktionen in Form von erhöhter Makrophagen- und T-Zell-Invasion. Ebenfalls kann eine erhöhte MHC-I-Expression im Zusammenhang mit Makrophagen, wie auch in regenerierenden Fasern oder morphologisch unauffälligen Fasern nachgewiesen werden (22). Es wird angenommen, dass es durch die gestörte Membranreparatur zum Austritt von Bestandteilen aus dem intrazellulären Raum kommt, die als endogene Trigger für das Immunsystem dienen und somit eine inflammatorische Antwort auslösen (32). Im fortgeschrittenen Stadium zeigt sich ein fettgewebiger Umbau der Muskulatur (33). Muskeldegeneration und reduzierte Muskelkraft sind die Folgen.

Wie auch in anderen Muskeldystrophien konnten in Muskelbiopsien von Patienten mit Dysferlinopathie Anomalien der Mitochondrien nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die Mitochondrienfunktion einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Dysferlinopathie hat (34).

Durch die Überexpression des dysferlinähnlichen Proteins Myoferlin (auch zur Familie der Ferline gehörend) in dysferlindefizienten Mäusen, konnte gezeigt werden, dass Myoferlin die Aufgaben des Dysferlins teilweise übernehmen kann und es zu einer verbesserten Membranreparatur kommt (35). Allerdings führte dies zu keiner Veränderung der Muskelhistologie. Folglich steht die sarkolemmale Reparatur nicht in direkter Korrelation mit den pathologischen Auswirkungen auf die Muskelfaser. Daraus

ergibt sich, dass Dysferlin zwar an der Membranreparatur beteiligt scheint, jedoch auch für andere zelluläre Prozesse essentiell ist (35).

2.2.4 Klinisches Bild

Die Symptome der Dysferlinopathie treten meist erstmals im jungen Erwachsenenalter in Form von zunehmender Muskelschwäche auf. Der durchschnittliche Erkrankungsbeginn liegt bei 19 Jahren (36). Auffallend ist, dass die Patienten häufig darüber berichten, in Kindheit und Jugend sportlich sehr aktiv gewesen zu sein (37).

Die klinische Unterteilung der Dysferlinopathien erfolgt durch die primär betroffenen Muskelgruppen. Bei der Gliedergürtelmuskeldystrophie 2B sind zunächst meist proximale Muskelgruppen wie vor allem der Beckengürtel und seltener der Schultergürtel betroffen. Die Patienten berichten daher beispielsweise über Schwierigkeiten beim Treppensteigen. Bei der Miyoshi Myopathie ist klassischerweise früh die distale posteriore Unterschenkelmuskulatur (vor allem der M. gastrocnemius) betroffen. Es fällt den Patienten daher schwer auf den Zehenspitzen zu stehen, während der Hackengang meist noch möglich ist (38). Die klinische Unterteilung in LGMD2B und MM ist jedoch nicht stets eindeutig und im weiteren Krankheitsverlauf sind zunehmend auch übergreifende Muskelgruppen betroffen.

Beiden Formen gemein ist die progredient zunehmende Muskelatrophie, wodurch es meist innerhalb von zehn bis fünfzehn Jahren zum Verlust der Gehfähigkeit kommt. Studien zur klinischen Ausprägung der Dysferlinopathie weisen wiederholt auf eine große Heterogenität hin (17, 18, 39, 40). Daher ist anzunehmen, dass es andere Einflussfaktoren gibt, die den Krankheitsverlauf determinieren. Insbesondere sind interindividuelle Unterschiede bezüglich der Geschwindigkeit des Fortschreitens, als auch der betroffenen Muskeln, zu beobachten. Auch innerhalb einer Familie gibt es große individuelle Varianzen (40, 41). Eine Vorhersage über den Krankheitsverlauf jedes einzelnen Patienten ist daher nicht möglich. Die Dysferlinopathie ist primär nicht durch muskuläre Schmerzen gekennzeichnet. Durch Paresen einzelner Muskeln kann es jedoch zu Fehlhaltungen und Fehlbelastungen von Muskeln, Sehnen, Bändern und Gelenken kommen. Dadurch können sekundär Schmerzen auftreten.

Zum Diagnosezeitpunkt ist die Funktion der Herzmuskulatur und der Atemmuskulatur meist nicht beeinträchtigt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Paresen im Krankheitsverlauf ebenfalls Zwerchfell-, Brustwand-, Bauchwand- und

Herzmuskulatur betreffen. Die Lungenfunktion kann beispielsweise durch eine Reduktion der funktionellen Vitalkapazität beeinträchtigt werden, wodurch gegebenenfalls eine künstliche Beatmung erforderlich wird (42). In den Kardiomyozyten kann die Lokalisation des Dysferlins an den Glanzstreifen gezeigt werden (43). Dennoch kann in der Mehrzahl der Patienten keine kardiale Beteiligung nachgewiesen werden (44, 45). Eine subklinische Beteiligung ist in einzelnen Fällen jedoch möglich (46, 47). Im Mausmodell kann vor allem durch mechanischen Stress bei dysferlindefizienten Mäusen eine kardiale Fibrosierung und eingeschränkte linksventrikuläre Auswurfraction nachgewiesen werden (46). Vor allem durch das gleichzeitige Fehlen von Dysferlin und Dystrophin in Double-Knock-Out-Mäusen kann eine schwerere kardiale Beteiligung induziert werden (48). Die kardiale und pulmonale Funktion sollte bei Patienten mit Dysferlinopathie daher regelmäßig kontrolliert werden, um rechtzeitig das therapeutische Vorgehen dem Krankheitsverlauf anpassen zu können (49).

2.2.5 Diagnostik

Der Fokus der ausführlichen klinisch-neurologischen Untersuchung liegt auf der Bestimmung der Muskelkraft, dem Muster der Paresen und dem Verlauf mit Fortschreiten der Erkrankung (siehe 2.2.4). Zudem werden Sekundärveränderungen wie Kontrakturentwicklungen überprüft.

Laborchemisch lassen sich isoliert über einen längeren Zeitraum bestehende erhöhte Kreatin-Kinase-Werte (CK) als Zeichen der muskulären Schädigung nachweisen. Erhöhungen der CK um das 100fache sind möglich (36). Zur weiteren Diagnostik kann eine Muskelbiopsie mit histologischer und immunhistochemischer Charakterisierung durchgeführt werden. Immunhistochemisch lässt sich das vollständige Fehlen oder eine reduzierte Expression von Dysferlin an der Fasermembran nachweisen (6). Histologisch zeigen sich allgemeine Zeichen einer Dystrophie in Form von Faseratrophie, Nekrosen, lobulierten Fasern (sogenannten Split-Fasern), erhöhter Anzahl an regenerierenden Fasern und Fasern mit zentralisierten Nuklei (29, 50). Außerdem können entzündliche Infiltrate zum histologischen Bild gehören. Hierbei überwiegt die vermehrte Einwanderung von Makrophagen der T-Zell-Expression. Eine vermehrte MHC-I-Expression lässt sich zum Teil ebenfalls nachweisen und ist Hinweis für eine Beteiligung des Komplementsystems bei der Pathophysiologie der Dysferlinopathie (51,

52). Die entzündlichen Prozesse im histologischen Bild können zur Fehldiagnose einer inflammatorischen Myopathie wie z.B. der Polymyositis führen. Weiterführend kann die Darstellung des Proteins mittels Western Blot oder Antikörperfärbung sein. Zur Diagnosesicherung sollte jedoch immer eine genetische Untersuchung durchgeführt werden (53). Zusätzliche Bildgebung kann mittels MRT erfolgen, wodurch sich der Umbau des Muskelgewebes in Fettgewebe zeigen lässt (54). Im klinischen Alltag hat dies jedoch nur wenig Relevanz und wird bisher eher zu Forschungszwecken eingesetzt. Bei Nachweis einer Mutation des Dysferlingens muss die Beteiligung weiterer Organsysteme beispielsweise durch eine kardiologische Abklärung erfolgen. Darüber hinaus sollten insbesondere alltagsrelevante Einschränkungen und Sturzgefahr erhoben werden um durch entsprechende Hilfsmittel unterstützt werden.

2.2.6 Therapeutisches Regime

Derzeit existiert für Patienten mit Dysferlinopathie kein kausales therapeutisches Konzept mit Aussicht auf Heilung. Die Betreuung der Patienten konzentriert sich daher vor allem auf die Erhaltung oder Förderung der Lebensqualität und der Vermeidung von Komplikationen. Den Patienten wird zur Beibehaltung der Beweglichkeit und zur Vermeidung von Fehlbelastungen und Kontraktionen Physiotherapie angeboten. Ergotherapeutische Maßnahmen zielen auf den möglichst langen Erhalt der Selbstständigkeit ab und sollen alltagsrelevante Gefahren minimieren. Des Weiteren erfolgen regelmäßige ärztliche Untersuchungen zur Dokumentation der Paresen und der pulmonalen und kardialen Leistungsfähigkeit. Gegebenenfalls werden Ateminsuffizienz bzw. myokardiale Insuffizienz entsprechend behandelt. Eine genetische Beratung von Patienten und Angehörigen gehört ebenfalls zur Betreuung. Darüber hinaus ist das Angebot von Informationsmaterial, die soziale Anbindung an Patientengruppen und Netzwerke sowie der Zugang zu therapeutischen Studien wichtiger Bestandteil der Versorgung.

2.2.7 Therapieansätze in der Forschung

Ansatzpunkte der derzeitigen Forschung zur Entwicklung eines Therapiekonzeptes für die Dysferlinopathie beinhalten das Eingreifen auf genetischer Ebene, RNA-Ebene oder Proteinebene. Präklinische Studien befassen sich mit der Untersuchung humaner

Muskelzellen oder bereits existierender Knock-Out-Mausmodelle. Wenige Arbeitsgruppen beschäftigten sich bisher mit dem Einsatz klassischer medikamentöser Therapien in diesem Indikationsfeld.

Die Größe des Dysferlings von 237 kDa überschreitet die Transportkapazität adenoviraler Vektoren. Bislang war es *in vivo* jedoch möglich, das 5'- und 3'-Ende der *DYSF* cDNA in zwei separaten Vektoren zu überführen und später zum vollständigen Dysferlin zusammenzuführen (55, 56). Mittels des nonviralen Gentransfervektors „*Sleeping Beauty*“, welcher aus einer Transposon-DNA und einer Transposase besteht, konnte der Transfer des gesamten humanen Dysferlings in murine Myoblasten ermöglicht werden und bewirkte dort eine adäquate Dysferlinproduktion.(57).

Pryadkina und Kollegen konnten nach intramuskulärer Injektion des Dysferlings mit dem rAAV8-Vektor in Overlap-Methode die Dysferlinmenge in dysferlindefizienten Mäusen auf das 0,5-2 fache erhöhen (58).

Durch alternatives Spleißen mit einem Prä-mRNA *trans-splicing-Molekül* konnte sowohl in humanen LGMD2B-Myoblasten *in vitro*, als auch in dysferlindefizienten Mäusen *in vivo* korrekt gefaltetes und funktionsfähiges endogenes Dysferlin nachgewiesen werden (59).

Die Applikation des Poloxamers P188 bewirkte durch eine Verbesserung der Muskelmembranreparatur eine Reduktion der Muskelatrophie in dysferlindefizienten SJL/J-Mäusen (60).

Ein weiterer Ansatzpunkt in der Behandlung von Muskeldystrophien im Allgemeinen beschreibt die Therapie mit Satellitenzellen (muskulären Stammzellen). Diese verfügen über ein Regenerationspotenzial für die Muskelfasern, welches in erkrankten Muskeln begrenzt ist. Die erfolgreiche Generation von Satellitenzellen *in vitro*, die später in Patientenmuskeln transplantiert werden könnten, stellt daher in Kombination mit neuen Genreparaturmechanismen wie der CRISP/Cas-Methode, mit der Gene und Nukleotide gezielt eingefügt oder ausgeschnitten werden können, einen vielversprechenden Schritt für therapeutische Interventionen im Bereich der Muskelerkrankungen dar (61).

Klinische Studien zur Dysferlinopathie umfassen sowohl die grundlegende Charakterisierung der Erkrankung als auch die Erprobung medikamentöser Therapien.

Angesichts der entzündlichen Veränderungen der Muskulatur bei Dysferlinopathie scheint eine Therapie mit Glukokortikoiden naheliegend. Der Therapie mit dem Glukokortikoid Deflazacort an Dysferlinopathie-Patienten führte jedoch neben einer Verschlechterung der Muskelkraft zu dem gehäuften Auftreten unerwünschter

Nebenwirkungen wie gastrointestinale Beschwerden und Gewichtszunahme durch die steroidale Therapie (62).

An humanen dysferlindefizienten Myoblasten konnte *in vitro* durch Applikation des Proteasominhibitors Bortezomib, über die Hemmung des vorzeitigen Abbaus, das endogene, fehlgefaltete Dysferlin an die Muskelmembran verlagert werden und eine verbesserte Membranreparatur erzielt werden (63). Die Publikation zu den Ergebnissen der daraufhin initiierten klinischen Studie musste kürzlich auf Grund potentieller Fehler bei der Darlegung der Ergebnisse zurückgezogen werden (64).

Ein weiterer Therapieansatz beinhaltet die direkte intramuskuläre Injektion eines Genvektors in den M. extensor digitorum brevis. Im Mausmodell konnte hierdurch die Dysferlinexpression erhöht und die intramuskuläre Inflammation reduziert werden (56). Derzeit wird unter der Leitung von Jerry Mendell am *Nationwide Children's Hospital*, Columbus, USA, die potentielle Toxizität des Genvektors an Dysferlinopathie-Patienten in einer Phase-I-Studie getestet (65).

Eine laufende klinische Studie mit über 200 Erkrankten an mehr als 15 Zentren weltweit befasst sich aktuell mit der Charakterisierung des Krankheitsverlaufes der Dysferlinopathie sowie der Identifikation von Parametern, die den Status der Erkrankung definieren. Ziel ist es, eine Grundlage für künftige klinische Studien zu schaffen und umfassendere Erkenntnisse zu gewinnen, wodurch die Patientenbetreuung zukünftig optimiert werden kann (66).

2.2.7.1 Mausmodelle

Es existieren derzeit zehn Mausmodelle mit Mutationen im Dysferlingen (siehe Tab. 1). Zwei davon sind natürlich vorkommende Tierarten mit genetischen Veränderungen im Dysferlingen, die charakteristische Merkmale einer progredienten Muskelerkrankung zeigen. Die SJL/J-Maus trägt eine Splice-Mutation im Dysferlingen. Hierdurch kommt es zu einer Deletion in Exon 45 und damit zum Verlust einer C2-Domäne. Die A/J-Maus trägt eine Retrotransposon-Insertion in Intron 4, welches sich in der Nähe des 5'-Endes des Dysferlingens befindet (67). Das Resultat ist in beiden Fällen eine fehlende Dysferlinexpression und damit verbundene eingeschränkte Membranreparatur. Sowohl die SJL/J-Maus als auch die A/J-Maus zeigen charakteristische Merkmale einer progredienten Muskelerkrankung. Dazu zählen histologische Merkmale wie eine vermehrte Regeneration, Nekrosen, Muskelfaseratrophien, Zentralisation der Nuklei,

Fetteinlagerungen, Zellinvasion von Entzündungszellen und bindegewebiger Umbau der Muskulatur. Auch lässt sich eine Dominanz der Typ-I-Fasern nachweisen, was eine Typ-II-Faseratrophie nahelegt (28). In Bezug auf die betroffenen Muskelgruppen sowie den Verlauf der Erkrankung unterscheiden sich die Modelle (29). Im Allgemeinen zeigen die Mausmodelle für Dysferlinopathie keine eindeutige Muskelschwäche. Die funktionelle Verbesserung durch Therapieversuche lässt sich aus diesem Grund nur begrenzt bewerten. Bedeutender ist daher mehr das histologische Bild. Die SJL/J-Maus zeigt neben den genannten muskulären Veränderungen eine hohe Inzidenz an Lymphomen, Autoimmunerkrankungen und viralen Infektionen (68, 69). Sie besitzt ebenfalls eine homozygote Mutation in einem Allel für retinale Degeneration (Pde6b-Gen) und ist daher eher ungeeignet für die Anwendung in Interventionsstudien (70). Neben der SJL/J-Maus und der A/J-Maus gibt es acht weitere gezüchtete Mausmodelle. Drei davon sind die Knock-Out-Modelle: *Dysf*^{-/-}-mice (B6.129Dysf^{tm1Kcam}/J), B6;129S6-Dysf^{tm2.1Kcam}/J. und *Dysf*^{-/-}(129-Dysf^{tm1KCam}/J. Die B6.Cg-Tg(Ckm-DYSF)3Cam/J-Maus ist eine C57BL/6-Maus mit dem menschlichen Dysferlingen. In den restlichen vier Modellen wurden die SJL/J- oder A/J-Mutationen auf einen anderen murinen Hintergrund zurückgekreuzt (C57BL/6, C57BL/10, SCID). Die genetischen Veränderungen induzieren in den genannten Mausmodellen ein vollständiges Fehlen von Dysferlin. Ein Mausmodell mit Punktmutation und Proteinfehlfaltung gibt es bisher nicht.

Tab. 1 – Mausmodelle: Übersicht über die bestehenden Mausmodelle mit Dysferlinopathie

Mausmodell	Genetische Veränderung	Hintergrund	Hersteller/ Lieferant	Krankheitsverlauf
1) SJL/J-Maus	Deletion von Exon 45 des Dysferlingens	Natürlich vorkommend, ursprünglich gezüchtet aus drei Arten Swiss Webster Mäusen	The Jackson Laboratory, Maine, USA	Progrediente Muskelschwäche insb. der proximalen Muskulatur. Im Verlauf adipozytärer Umbau der Muskulatur, hohe Inzidenz an Lymphomen, Autoimmunerkrankungen und viralen Infektionen
2) A/J-Maus	Retrotransposon-Insertion in Exon 4	Natürlich vorkommend, ursprüngliche Züchtung aus Cold Spring Harbour albino und Bagg albino	The Jackson Laboratory, Maine, USA	Langsam progrediente Muskelschwäche insb. der abdominalen Muskulatur gefolgt von proximalen Muskeln und distalen Muskeln. Hohe Inzidenz an Adenomen der Lunge und Adenokarzinomen der Mammas. Homozygot für altersabhängigen Hörverlust und hämolytische

				Komplement-Defizienz.
3) <i>Dysf</i> ⁻ -Maus (B6.129Dysf ^{tm1Kcam/J})	Deletion Exon 53-55	C57BL/6	The Jackson Laboratory, Maine, USA	Histologische Dystrophiemerkmale mit 2 Monaten, zunehmend mit dem Alter, mit 8 Monaten alle Charakteristika einer Muskeldystrophie. Die Schwere der Pathologien variiert je nach Muskelgruppe.
4) B6;129S6- Dysf ^{tm2.1Kcam/J} -Maus	Deletion Exon 53-54	C57BL/6J	The Jackson Laboratory, Maine, USA	Nicht beschrieben
5) <i>Dysf</i> ⁻ -(129- Dysf ^{tm1Kcam/J} -Maus	Deletion Exon 53-55	C57BL/6 und B6.129	The Jackson Laboratory, Maine, USA	Erste histologische Dystrophiemerkmale mit 2 Monaten. Mit dem Alter zunehmend. Mit 8 Monaten alle Charakteristika einer Muskeldystrophie. Die Schwere der Pathologien variiert je nach Muskelgruppe.
6) B6.Cg-Tg (Ckm- DYSF) 3Cam/J- Maus	Expression des humanen Dysferlingens	C57BL/6	The Jackson Laboratory, Maine, USA	Keine Pathologien bis zu einem Alter von einem Jahr. Die endogen produzierte Dysferlinmenge ist um das 4- bis 8-fache erhöht.
7) B10.SJL- <i>Dysfim</i> /AwaJ-Maus	Enthält die SJL- Mutation	C57BL/10	Jain Foundation, Seattle, USA	Erste histologische Anzeichen der Erkrankung mit 4 Wochen, starke Ausprägung mit 8 Monaten in Form von fettgewebigen Einlagerungen, fibrotischen Umbau und Einwanderung inflammatorischer Zellen. Betroffen sind v.a. die Gliedergürtel. Erhöhtes Pyruvat und CK.
8) Bla/J-Maus (B6.A- Dysf ^{prmd} /GeneJ)	Enthält die A/J- Mutation	C57BL/6	Jain Foundation, Seattle, USA	Erste histologische Anzeichen der Erkrankung mit 2 Monaten (zentralisierten Nuklei, Inflammation) v.a. der Muskulatur der unteren Extremitäten. Funktionelle Einschränkungen sind in Laser-Wounding-Versuchen und in Form von eingeschränkter Ausdauer und verminderter Aktivität nachweisbar.
9) C57BL/6J- Chr6 ^{A/J} /NaJ-Maus	Enthält Chr. 6 inklusive des Dysferlingens der A/J-Maus	C57BL/6	The Jackson Laboratory, Maine, USA	Sehr ähnlich der A/J-Maus
10) SCID/BLAJ-Maus	Enthält die A/J- Mutation	SCID	The Jackson Laboratory, Maine, USA	Wie die Bla/J-Maus, zusätzliche B- und T-Zell-Defizienz, daher gut geeignet für Transplantationsstudien

2.2.7.2 Therapieansatz - Proteintherapie

An isolierten Muskelfasern von Dysferlinopathie-erkrankten Patienten wurde *in vitro* ein proteinbasierter Therapieansatz getestet (71). Dieser stellt die Grundlage für die vorliegende Arbeit dar und wird hier daher genauer beschrieben.

Für den Versuch wurden zu den isolierten Muskelfasern Dysferlinpeptide mit einer Länge von zehn bis zwölf Aminosäuren appliziert. Es wurden zwei unterschiedliche Punktmutationen untersucht und entsprechende Peptide gewählt, die den Proteinabschnitt der Mutation umfassten und ebenso die ausgetauschte Aminosäure enthielten. Um einen rezeptorunabhängigen Zelleintritt zu gewährleisten, wurden die Peptide an das transaktivierende Transkriptionsprotein des humanen Immundefizienz-Virus gekoppelt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass das fehlgefaltete endogene Dysferlin anstatt abgebaut zu werden, zurück an die Zellmembran verlagert wurde. Ein beschleunigter Membranreparaturprozess nach Schädigung der Muskelfasern mittels Laser weist darauf hin, dass auch funktionell eine Verbesserung durch das angewandte Verfahren erreicht werden konnte (71). Die humanen Muskelfasern wurden aus entsprechenden Muskelbiopsien von Patienten isoliert. Sie stammen von Patienten, die der Hochschulambulanz für Muskelkrankheiten an der Charité in Berlin Buch betreut werden. Diese Patienten gehören zu einer familiären Kohorte, welche eine homozygote Punktmutation (*DYSF* p.L1341P) in Exon 38 trägt.

2.2.7.3 Die MMex38-Maus

Zur *in vivo* Anwendung des zuvor in 2.2.7.2 beschriebenen Therapieansatzes in einem Tiermodell mit endogenem fehlgefaltetem Dysferlin wurde in Zusammenarbeit mit dem Max-Delbrück-Centrum Berlin ein Mausmodell generiert - die MMex38-Maus („Missense Mutation“ in Exon 38). Die Punktmutation *Dysf* c.4079T>C (p.L1360P) in Exon 38 des murinen Dysferlins (Dysferlinisoform 2, NP_001071162.1) entspricht humanen Mutation *DYSF* c.4022T>C (p.L1341P), und führt zum Aminosäureaustausch von Leucin zu Prolin.

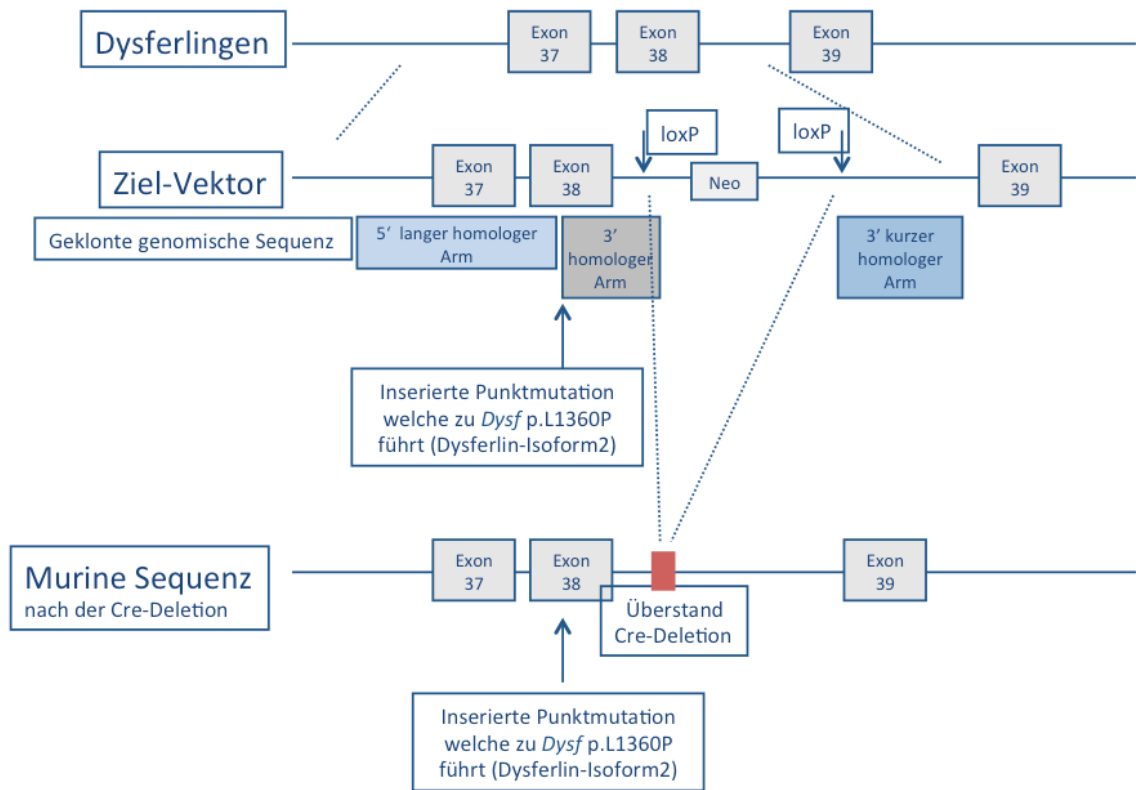


Abb. 2 - Generierung des Mausmodells (Dr. med. V Schöwel): Einfügen des mutationsenthaltenden Vektors mittels „site-directed mutagenesis“, loxP = engl. locus of X-over P1 = DNA-Ansatzstelle der Rekombinase, Neo = neomycinresistente Kasette zur Selektion, Cre-Deletion = Rest-DNA der neomycinresistenten Kasette nach herausfloxen (Cre = engl. cyclization recombination).

Die MMex38-Maus ist das erste Mausmodell für die Dysferlinopathie mit einer Punktmutation im Dysferlingen. Durch die Punktmutation wird fehlgefaltetes Dysferlin gebildet.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der MMex38-Maus mit der Absicht, bei erfolgreicher Generierung des Mausmodells das oben genannte *in vitro* getestete Verfahren zur Dysferlinrettung im Mausmodell anwenden zu können.

2.2.7.4 Ketogene Diät

Es ist bekannt, dass Dysferlin an der Reparatur kleiner Mikroläsionen der Muskelmembran beteiligt ist. Unklar ist jedoch, weshalb es erst im jungen Erwachsenenalter zu ersten Symptomen der Muskeldystrophie kommt. Auch ist nicht geklärt, weshalb insbesondere die glykolytischen Typ-II-Muskelfasern von einer Atrophie betroffen sind (28).

Unsere aktuellen Daten zur Dysferlinopathie (nicht veröffentlicht) weisen darauf hin, dass Dysferlin insbesondere am Metabolismus der Typ-II-Fasern beteiligt ist. Die schnellen Typ-II-Fasern nutzen zur Energiegewinnung hauptsächlich Glukose und verfügen physiologischerweise über einen hohen Glykogenspeicher. In unserem Labor wurden Muskeln von dysferlindefizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen sowie humane Muskelzellen von Patienten und gesunden Probanden metabolisch mit der GC/MS-Technik (Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung) untersucht. Die dabei gewonnenen Daten zeigen, dass bei Dysferlindefizienz die Glykolyse in den schnellen Typ-II-Fasern nicht effizient stattfinden kann und weniger Glykogen gespeichert wird. Man kann vermuten, dass durch die fehlerhafte Glykolyse radikale Sauerstoffspezies entstehen, die zum Zellstress führen und somit den Zelluntergang, insbesondere der Typ-II-Fasern, begünstigen. Durch eine angepasste kohlenhydratarme und fettreiche Diät wollten wir daher versuchen, diesen Zellstress zu minimieren und somit Faseratrophie zu umgehen. Bei langfristiger Ernährungsumstellung bilden Ketonkörper und Fettsäuren die Grundlage der Energiegewinnung. Bei dysferlindefizienten Mäusen lassen sich bereits bei standardmäßiger Ernährung erhöhte Ketonkörperspiegel in der Leber nachweisen. Da jedoch die oral aufgenommene Glukose eine Induktion der Glykolyse bewirkt, werden die vermehrt vorhandenen Ketonkörper nicht zur Energiegewinnung genutzt. Bei Dysferlindefizienz wird die Energieproduktion also nicht von selbst umgestellt. Die Glukoseverwertungsstörung kann nicht kompensiert werden, da Glukose generell als Energiesubstrat angeboten wird. Die Vermutung ist, dass glykolytische Muskelfasern dadurch vermehrt Zellstress ausgesetzt werden, wodurch es zur Typ-II-Faseratrophie kommt. Eine langfristige Umstellung der Ernährung und damit der Energieverwertung könnte bei Patienten mit Dysferlinopathie daher zu einer verminderten Progredienz der Symptomatik führen, z.B. durch die ebenso verbesserte Membranreparatur von Mikroläsionen (72, 73).

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich daher damit, anhand der MMe38-Maus die Auswirkungen einer ketogenen Diät auf die Muskelphysiologie und -histologie bei der Dysferlinopathie zu beschreiben.

2.3 Bedeutung und Ablauf von Tierversuchen

Alle Untersuchungen, die am lebendigen Tier durchgeführt werden, müssen zuvor vom Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt werden. Gesellschaftlich ist das Forschen an Tieren ein umstrittenes Thema. Für die Entwicklung von Therapiekonzepten ist es jedoch noch immer unentbehrlich. Klassischerweise werden neue Verfahren und Interventionen zunächst *in vitro* an humanen oder beispielsweise murinen Zellen getestet. Hat sich ein Versuch als erfolgreich gezeigt, kann im zweiten Schritt am lebenden Tier *in vivo* die Effektivität bestätigt und eventuelle Nebenwirkungen dokumentiert werden.

In diesem Falle konnte an humanen Myotuben gezeigt werden, dass die Applikation der Dysferlinopathie-spezifischen Peptide einen therapierelevanten Ansatz darstellt. Einige Verhältnisse lassen sich dennoch auf *in vitro* Ebene nicht hinreichend rekonstruieren:

1. Die untersuchten Myotuben in der Zellkultur stellen ein Zwischenstadium bei der Entstehung von intakten Muskelfasern dar. Es handelt sich hierbei um fusionierte, mehrkernige Muskelzellen. Die sarkomere Struktur ist jedoch nicht vollständig ausgebildet und Länge und Breite sind weit entfernt von den späteren Dimensionen der Muskelfasern.
2. Eine physiologische mechanische Belastung der Muskelfasern kann im Zellmodell nur eingeschränkt simuliert werden und die entstehenden Zellschäden sind *in vivo* deutlich variabler.
3. Die Membranreparatur ist ein vielschichtiger Prozess, von dem anzunehmen ist, dass nicht nur die beschädigte Muskelfaser, sondern auch umliegende Gewebe beteiligt sind. Dies nachzuweisen ist jedoch schwierig, da *in vitro* keine Studien dazu durchgeführt werden können.
4. Das Peptid als therapeutische Substanz wird anhand eines zellpenetrierenden Proteins in die Muskelfaser gebracht. Grundlegende Fragen zur Pharmakokinetik können letztendlich nur *in vivo* nach systemischer oder lokaler Applikation getestet werden.

Dies erklärt hinreichend, dass es keine anderen Methoden oder Verfahren gibt, um das Versuchsergebnis zu ermitteln und somit ein Versuch an Tieren unerlässlich ist. Voraussetzung dafür ist jedoch ein geeignetes Mausmodell, das den humanen Verhältnissen möglichst nahekommt.

Bei der Durchführung von Tierversuchen muss außerdem vorher sichergestellt werden, dass keine Studien existieren, die den gleichen Sachverhalt untersuchen und das angestrebte Versuchsergebnis daher noch nicht hinreichend bekannt ist, sodass keine Tiere durch überflüssige Versuche zu Schaden kommen.

Es gibt bisher kein Tiermodell für die Dysferlinopathie, welches durch eine Punktmutation hervorgerufen wird.

Letztlich muss darauf geachtet werden, dass die Anzahl der untersuchten Tiere stets so gering wie möglich gehalten wird. Da es sich hierbei um eine Pilotstudie handelt, lassen sich im Voraus keine statistischen Fallzahlberechnungen durchführen.

Zur Orientierung wurden daher Voruntersuchungen an den oben erwähnten BLA/J-Mäusen betrachtet. Sowohl histologisch als auch physiologisch sind im Alter von zwölf Wochen bei sechs Tieren pro Gruppe signifikante Unterschiede zu verzeichnen.

Während eines laufenden Versuches ist stets auf das Wohl der Tiere zu achten. Dies beginnt bei der artgerechten Haltung der Tiere. Tierpfleger oder Experimentverantwortliche müssen sich außerdem täglich über den Gesundheitszustand des Labortieres informieren. Sollten die Versuchstiere in irgendeiner Weise durch die Experimente Schmerz oder Leiden ausgesetzt sein, muss dies immer gut begründet werden. Die Tötung eines Versuchstieres erfolgt stets unter vorheriger Betäubung und ohne Leiden für das Tier. Erkrankt ein Tier im Laufe einer Studie, kann es als Versuchstier nicht weiterverwendet werden und ein Tierarzt entscheidet über das weitere Vorgehen.

Es muss des Weiteren belegt werden, dass die für die Durchführung benötigten Anlagen, Geräte und sonstigen sachlichen Mittel zur Verfügung stehen und dass die Unterbringung und Pflege sowie medizinische Versorgung der Versuchstiere gewährleistet werden kann. Darüber hinaus müssen alle am Versuch beteiligten Personen die erforderliche Ausbildung im Umgang mit Tieren erhalten haben. Generell müssen sämtliche Eingriffe und Tätigkeiten an den Tieren fortlaufend dokumentiert werden.

So soll gewährleistet werden, dass bei der Durchführung von Tierversuchen stets das Wohl des Tieres im Vordergrund steht und damit die Opferung der Tiere zum Zwecke der Wissenschaft auf eine moralisch und ethisch vertretbare Weise erfolgt.

2.4 Forschung zu seltenen Erkrankungen

Die europäische Union definiert eine Erkrankung als selten, wenn maximal fünf von 10.000 Menschen in der EU an ihr erkrankt sind. Weltweit gibt es ca. 8.000 Erkrankungen die diese Definition erfüllen. Insgesamt ist die Anzahl der Betroffenen aller seltenen Erkrankungen daher hoch. Nach Schätzungen leben in Deutschland etwa vier Millionen Menschen mit einer seltenen Erkrankung. In der gesamten EU sind es etwa 30 Millionen Erkrankte (74, 75). Die Dysferlinopathie gilt als eine solche seltene Erkrankung.

Für die seltenen Erkrankungen gibt es oft keine zugelassenen Therapien. Letztlich sind von jeder einzelnen Erkrankung nur wenige betroffen. Der Absatzmarkt für ein potentiell Therapeutikum wäre desto kleiner, je spezifischer die Wirkungsweise wäre. Die geringe Prävalenz erschwert die Durchführung klinischer Studien; Bei zu geringer Fallzahl können keine statistisch signifikanten Ergebnisse erreicht werden, es existieren häufig ungenügende Daten zum natürlichen Krankheitsverlauf und keine Biomarker zur Überwachung der Progression. Obwohl die seltenen Erkrankungen in der Mehrzahl genetisch vererbt werden, zeigen sie häufig einen variablen Phänotyp. Dies macht es schwierig, klinische Endpunkte festzulegen. Die geringe Anzahl der Erkrankten erschwert darüber hinaus die Planung klinischer Studien. Um eine ausreichende Anzahl an Studienteilnehmern zu rekrutieren werden klinische Studien zu seltenen Erkrankungen häufig multizentrisch in verschiedenen Ländern, an spezialisierten Zentren durchgeführt. Hierdurch entsteht ein hoher ökonomischer und logistischer Aufwand. In der europäischen Union und den USA gibt es daher Förderprogramme zur Erforschung seltener Erkrankungen und zur Erleichterung der Entwicklung von Therapiekonzepten (76).

Dadurch, dass es nur wenige Betroffene jeder einzelnen Erkrankung gibt, haben Patienten mit einer seltenen Erkrankung oft nur eine kleine Lobby. Die *Jain Foundation* ist eine private Stiftung, die die Forschung für die Dysferlinopathie als seltene Krankheit vorantreibt und mit ihren Aktivitäten tatsächlich Bewegung in das Forschungsfeld gebracht hat. Angetrieben durch die Dysferlinopathieerkrankung seines Sohnes

gründete Ajit Jain 2005 die *Jain Foundation*. Die gemeinnützige Organisation unterstützt diverse therapierelevante Studien rund um die Dysferlinopathie und ist verantwortlich für viele wissenschaftliche Entwicklungen bis hin zu klinischen Studien (77, 78). Die Stiftung vermittelt Informationen über die Erkrankung an Betroffene und Angehörige und stellt den Kontakt zu laufenden klinischen Studien her. Die *Jain Foundation* möchte außerdem dabei helfen, den Austausch und den Kontakt zwischen Wissenschaftlern weltweit zu fördern, die sich mit Dysferlin und der Dysferlinopathie beschäftigen. Seit der Gründung der Organisation ist die Anzahl der Veröffentlichungen zum Thema Dysferlin von ca. 120 auf über 400 gestiegen.

Auch die vorausgegangene Studie zur Therapie der Dysferlinopathie mittels Dysferlinpeptide, die zu dieser Arbeit hinführte, wurde durch die *Jain Foundation* gefördert.

3 Material

Versuchstiere	
C57BL/6NCrl	Charles River
Tiernahrung	
ssniff® M-Z (Standardfutter)	ssniff Spezialdiäten GmbH #V1185-3
Ketogene Diät	Bio-Serv # F3666, F8505, F8000
Genotypisierung	
Proteinkinase K	PEQLAB #0314_D
Direct-PCR-Tail	VWR #VIAG102-T
Biozym LE Agarose	Biozym #840004
PCR Master Mix (2x): dNTPs, 10x Puffer, Enhancer, MgCl ₂	Promega #M7502
Primer A (Long5_7)	BioTeZ Berlin Buch GmbH, Berlin, Deutschland
Primer B (Dysf-LoxP flank reverse1)	BioTeZ Berlin Buch GmbH, Berlin, Deutschland
Primer C (DualNeo rev1)	BioTeZ Berlin Buch GmbH, Berlin, Deutschland
Primer D (DualNeo FRT_forw4)	BioTeZ Berlin Buch GmbH, Berlin, Deutschland
Primer E (Genopt3_rev)	BioTeZ Berlin Buch GmbH, Berlin, Deutschland
Gold Taq	Promega #M7833
Biopsie-Aufarbeitung	
Tragacanth-Pulver	Merck # 1.08405.0500
Glycerin, wasserfrei	Roth #3783.1
Chrystal Thymol	Synopharm #222575-0003
Gum Tragacanth	10,5 g Tragacanth-Pulver, 4,2 ml Glycerin, wenige Krümel Thymol
2-Methybutan (Isopentan) > 99 %	Roth #3927.1
Lösungsmittel	
Isofluran (Forene) 100 %	Abbott #6006832
Formaldehyd 10 % gepufferte Lösung	Roth #A146.3
Methanol 80 %, 100 %	Roth #7342.1
Ethanol vergällt 90 %, 100 %	Roth #K928.4
Aceton	Merck #1.0063.10 1l
Xylene > 98 %	Roth #9713.3

Isopropanol	Roth #CP41.1
Glacial Acetic Acid	Merck #1.00063
Chromotrope 2R	Sigma #C3143
Fast Green FCF	AppliChem #A1401.0010
Phosphotungstic Acid	Merck #1.00583.0100
Gill's II Hematoxylin	Merck #1.05175.0500
Schiff's Reagent	Roth #X900.1
Propionat	Merck #8.00605.0500
1,4 Dioxan	Merck #1.09671.2500
Petroleum Ether	Merck #1.59542.0500
Paraperiodische Säure	Merck #1.00524.0100
Sodium Metabisulfid	Merck #1.06528.0100
Salzsäure (HCl)	Merck #1.09063.1000
Grundstoffe	
Natriumhydroxid	Roth #9356.1
b-NADH, Grad III, Disodium Salt, 5 mg/Flasche	Sigma #N-9410
Natriumchlorid Pulver	Roth #9265.1
Natriumhydrogendiphosphat-Monohydrat	Roth #K300.1
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth #P030.2
Sodium-Bicarbonat	Sigma #s-5761
Natriumacetat wasserfrei	Merck #1.06268.0250
Kaliumchlorid	Roth #6781.1
Kaliumacetat	Roth #T874.1
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth 3904.1
Magnesiumsulfat	AppliChem #A4101.0500
Kalziumchlorid-Dihydrat	Roth #HN04.2
Aqua Mount	Thermo Fischer Scientific #143905
Proteaseinhibitor-Tabletten	Roche-Appliedsystems #11873580001
Puffer und Lösungen	
Tris	Roth #5429.3
Glycin	Roth #3908.2
SDS	Roth #0183.1
Saurer Alkohol	100 ml 80 % Methanol und 8 ml Aceton
Lithiumcarbonat gesättigt	Merck #1.05680.0250
Saline	0.85 g Natriumchlorid auf 100 ml destilliertes Wasser

Phosphatpuffer	19,5 ml von 0,343 g NaH ₂ PO ₂ ·H ₂ O/25 ml dH ₂ O und 80,5 ml von 1,410g Na ₂ HPO ₄ /100 ml dH ₂ O, mischen, auf pH 7,4 einstellen
Kongorot	AppliChem #A2385.025
Kongorot Working Solution #1	20 ml gesättigte Natriumchloridlösung und 200 µl 1 % NaOH, frisch ansetzen
Kongorot Working Solution #2	20ml Congorotlösung (0,2 g Congorot und 100 ml gesättigte Natriumchloridlösung und 200 µl 1 % NaOH, frisch ansetzen
Gesättigte NaCl-Lösung	80 ml Ethanol 100 %, 20 ml dH ₂ O und etwa 5 g NaCl, 24 h vor Gebrauch ansetzen
Kongorot -Lösung	0,2 g Kongorot und 100 ml gesättigte NaCl, 24 h vor Gebrauch ansetzen
Mayers Hämalum Lösung	Merck #1.09249.0500
Oil Red O	Merck 5230
Öl-Rot Stammlösung	Gesättigte Lösung: 300 mg Oil Red O in 100ml 99 %igem Isopropylalkohol
Öl-Rot Arbeitslösung	6 Teile Stammlösung mit 4 Teilen dH ₂ O mischen, 10 Minuten ruhen lassen, mit Nr. 42 Whatman Filterpapier filtern
Western Blot und Proteinanalyse	
Pierce BCA Protein Assay Kit	Bio-Rad # 5000001
Trenngel: Novex Tris-Glycine Gel	lifeTechnologies #EC60485BOX
Lysispuffer	1:10 PMSF und 1:10 Complete 100x in Lysispuffer (ganze Zelle)
Complete 100x	1 Proteaseinhibitor-Tablette in 500µl H ₂ O
Lysispuffer (ganze Zelle)	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5 % Triton x-100, 1 mM EDTA, 0,5 % Na-Deoxychelat, 1 mM Vanadat, 50 mM NaF
Triton x-100	Roth #3051.3
EDTA	Sigma Aldrich #E5134
Na-Deoxycholat	Sigma Aldrich #D6750
Vanadat (Ammoniummonovanadat)	Roth #5590.2
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth #6367.2
Marker: Page Ruler TM Plus	Thermo Fischer Scientific #26619
10x Blotting Puffer	In 500ml dH ₂ O: 14,65 g Glycin, 29g Tris, 1,85 g SDS
1x Blotting Puffer	50 ml 10x Blotting Puffer, 350 ml H ₂ O, 100 ml

	Methanol
Polyvinylidindifluorid-Membran	Sigma Aldrich #Millipore, IPVH00010
Tank-Blotting-System: Mini Protean 3	Bio-Rad (165-3322)
Tween	Merck #8.22.184.0500
10x TBS	100mM Tris, 1mM NaCl auf pH 7,3
1x TBS	100ml 10xTBS, 900ml dH2O
TBS-T	0,05 % Tween in 1xTBS
4 % Milchpulver	Roth #T145.2
10x PBS	Thermo Fischer Scientific #70011044
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Adrich #A7511
Hoechst	Sigma Aldrich #861405-100MG
Marker: Page Ruler TM Plus	Thermo Fischer Scientific #26619
Primäre Antikörper	
Dysferlin Hamlet, monoclonal, Maus	Novocastra, NCL Hamlet
Dysferlin Romeo, monoclonal, Kaninchen	Abcam #ab124684
Anti-Alpha-Tubulin, monoclonal, Maus	Sigma #T5168
Sekundäre Antikörper	
Cy3 goat anti rabbit	Dianova #111-165-144
Laser Wounding	
Laser Mikroskop	Zeiss LSM 700, HXP 120
Tyrode Lösung	140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl. 10 mM HEPES
MEM	Thermo Fischer Scientific #11095080
Complete MEM	27 ml MEM, 3 ml FCS, 24 µl Gentamycin
Fetaes Kälberserum (FCS)	Merck #SB115/1109B
Kollagenase I	Thermo Fischer Scientific #17100-017
Gentamycin	Thermo Fischer Scientific #15750037
Laminin	Sigma-Aldrich # L2020

4 Methoden

4.1 Versuchstiere

Das Mausmodell mit der Punktmutation in Exon 38 – MMex38 wurde durch Frau Dr. Verena Schöwel, Frau Prof. Dr. Simone Spuler (Charité, Berlin), Herrn Dr. Boris-Alexander Jerchow und Herrn Dr. Michael Bader (Max-Delbrück-Centrum, Berlin) generiert.

4.1.1 Tierhaltung

Die Züchtung mit der Mauslinie C57BL/6N sowie die Haltung der Tiere erfolgte im Tierhaus des Max-Delbrück-Centrums am Campus Charité Buch. Hierbei handelt es sich um einen keimarmen Bereich. Die Betreuung erfolgte durch die Tierpfleger in Absprache mit den versuchsdurchführenden Personen. Für die tierärztliche Betreuung war stets ein Tierarzt vor Ort.

Die Tiere wurden nach Geschlechtern getrennt mit ihren Wurfgeschwistern nach Gentypisierung in einem Käfig zu maximal fünf Tieren gehalten (Grundfläche 536 cm²). Die Beleuchtung im Tierhaus unterliegt einem Hell-Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden. Die Temperatur beträgt 21+/-1°C. Die Tiere hatten stets Wasser und Futter zur freien Verfügung.

Unter den männlichen Versuchstieren kam es oftmals zu aggressivem Verhalten untereinander. Sobald ein Tier Bisswunden aufwies, wurde es in einen getrennten Käfig gesetzt, sodass keine gravierenderen Verletzungen während des Versuches auftraten, welche die Vergleichbarkeit der Ausdauerleistung hätten beeinträchtigen können.

4.1.2 Genotypisierung

Die Ohrstanzen wurden mit 100 µl Direct PCR Lysisbuffer und 1 µl Proteinkinase K pro Probe bei 55°C und 550 RPM 3 Stunden inkubiert, anschließend wurden die Proteinkinase K bei 85 °C und 550 RPM für 45 Minuten deaktiviert. Danach wurde eine PCR zum Nachweis der Cre-Deletion und zur Positiven Selektion durchgeführt. Hierfür wurde aus folgenden Bestandteilen ein Mastermix angesetzt (Mengenangaben für je eine Probe mit 1 µl DNA): 0,5 µl dNTPs, 2,5 µl 10xPuffer, 2 µl MgCl₂, je 0,75 µl Primer,

11,8 µl dH₂O, 4 µl Enhancer und 0,2 µl GoldTaq-Polymerase. Je 1 µl DNA wurde also mit 22,5 µl Mastermix in ein Well pipettiert und die DNA mit den folgenden Protokollen (s. Tab. 2) polymerisiert.

Verwendete Primer:

- Nachweis der Cre-Deletion (Rest-DNA nach Herausfloren der neomycinresistenten Kasette): **Primer A, Primer B**
- Positive Selektion: **Primer C, Primer D**

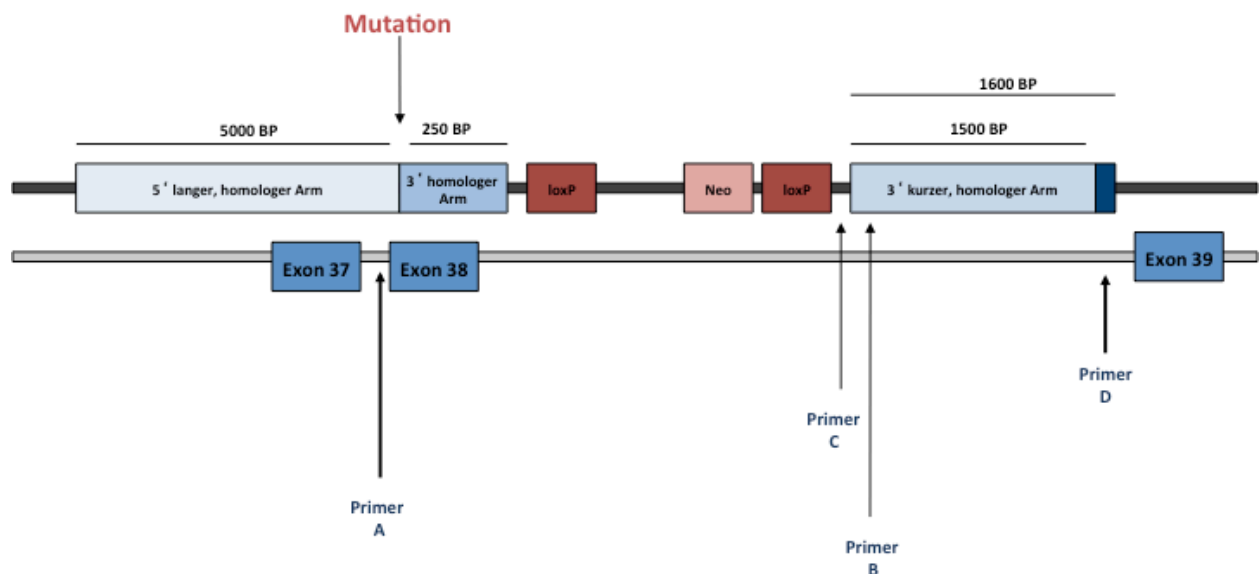


Abb. 3 – Primer: Ansatzpunkte der verwendeten Primer am Dysferlingen. BP = Basenpaare, loxP = engl. *locus of X-over P1* = DNA-Ansatzstelle für die Rekombinase, Neo = neomycinresistente Kasette zur Selektion, welche später durch die Cre-Rekombinase herausgefloxt wird. Übrig bleibt eine Rest-DNA = “Cre-Deletion” (Cre = engl. *cyclization recombination*).

Tab. 2: Protokolle für die Polymerase Kettenreaktion

Nachweis Cre-Deletion			Positive Selektion		
Programm: GoldTaq, annealing bei 58 °C			Programm GoldTaq, annealing bei 64,8 °C		
95 °C	10 min		95 °C	10 min	
95 °C	30 sek	Denaturierung	95 °C	30 sek	Denaturierung
58 °C	30 sek	Annealing	64,8 °C	30 sek	Annealing
72 °C	1 min	Elongation	72 °C	1,4 min	Elongation
40 Zyklen			40 Zyklen		
72 °C	10 min		72 °C	10 min	

4.2 Probengewinnung

Die Mäuse wurden nach Abschluss der unten stehenden Untersuchungen nach vorheriger Betäubung mit Isofluran durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde das Gesamtkörpergewicht ermittelt. Die Muskulatur der rechten Hinterläufe (M. quadriceps, M. extensor digitorum longus, M. tibialis anterior, M. gastrocnemius und M. soleus) wurde für Protein- und RNA-Analysen in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingefroren und aufbewahrt. Die Muskulatur der linken Hinterläufe (M. quadriceps, M. tibialis anterior und gemeinsam M. gastrocnemius und M. soleus) wurden für histologische Untersuchungen aufbereitet. Vor dem Einbetten wurde das Gewicht des M. tibialis anterior und des M. extensor digitorum longus ermittelt. Bei einigen Versuchsgruppen wurden zusätzlich Herz, Leber und Zwerchfell entnommen sowie Blut aus den Augenvenen.

4.3 Western Blot

Zur Lysierung der zu untersuchenden Muskeln wurde zunächst ein Lysispuffer hergestellt (siehe Materialien). Hierin wurden die Muskeln mit dem Handvortexer verkleinert, anschließend 30 Minuten auf Eis gelagert und dann bei 4 °C und 1300 RPM

zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und zwei Verdünnungen, 1:5 und 1:10, in Lysispuffer (ganze Zelle) wurden hergestellt. Für die Proteinbestimmung wurde das *Pierce BCA Protein Assay Kit* verwendet. Die 10fache Menge Farbstoff (Reagenz A und Reagenz B in 50:1) wurde hinzugegeben und weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messung der Proteinintensität erfolgte bei 562 nm.

Für den Western Blot wurden 40 µg und 80 µg Protein untersucht. Hierzu wurden die Proteinlysate im Lysispuffer verdünnt und mit 6x SDS-PP Farbstoff aufgefüllt. Die Proben wurden nach Zentrifugation für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen und die Kammern mit 1x-SDS-Laufpuffer befüllt. Bei 150 Volt wurden die Proben ca. 60 Minuten aufgetrennt. Das Gel wird in 1x Blotpuffer (1:10 10x Blotpuffer, 2:10 Methanol, 7:10 dH₂O) gewaschen und anschließend bei 18 Volt für 55 Minuten auf die Bot-Membran geblottet. Daraufhin wurde der Blot in Milchpulver (4 %) in TBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Die primären Antikörper wurden in Milchpulver (4 %) in TBS-T gelöst, zur Blot-Membran gegeben und über Nacht bei 4°C gelagert.

Primäre Antikörper und Verdünnung:

- *Novocastra*: „Hamlet“- Anti-Dysferlin monoklonaler Antikörper (Maus), 1:5000
- *Sigma aldrich*: Anti-α-Tubulin monoklonaler Antikörper (Maus), 1:3000

Am Folgetag wurde der Blot dreifach mit TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen und im Anschluss die sekundären Antikörper 1:5000 in TBS verdünnt und die Blots bei Raumtemperatur 45 Minuten damit inkubiert. Danach wurden die Blots zwei Mal mit TBS-T und ein Mal mit TBS für je fünf Minuten gewaschen. Die Bildgebung erfolgte mit dem *Odyssey LiCor*.

Dysferlin wurde bei 230 kDa detektiert. Um nachzuweisen, dass von jeder Probe die gleiche Menge Protein aufgetragen wurde, wurde zusätzlich α-Tubulin bei 50 kDa bestimmt.

4.4 Antikörper-Färbung

Die Gewebeschnitte wurden zunächst in gekühltem Aceton 100 % bei -20 °C fünf Minuten fixiert und zehn Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte eine Stunde mit bovinem Serumalbumin (BSA, 1 %) in

Phosphatpuffer (phosphate buffered saline solution = PBS) bei Raumtemperatur geblockt. Daraufhin wurde der primäre Antikörper (*Sigma aldrich*: „Romeo“-Anti-Dysferlin polyklonaler Antikörper, Kaninchen, Verdünnung 1:100) in BSA (1 %) aufgetragen und die Proben über Nacht bei 4 °C gelagert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte drei Mal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (*Cy3 Ziege-anti-Kaninchen*, Verdünnung 1:500 in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde zum Färben der Zellkerne Hoechts (Verdünnung 1:5000 in PBS) für fünf Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Daraufhin wurden die Proben je drei Mal für fünf Minuten mit PBS bei 4 °C und ein Mal für fünf Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Einbettung erfolgte mit *AquaMount*.

4.5 Ausdauerterest mit dem Laufband

Der Ausdauerterest auf dem Laufband diente der funktionellen Einschätzung der Muskelkraft und der Muskelausdauer. Das Laufbandprotokoll erfolgte über einen Zeitraum von drei Wochen. Innerhalb dieser Zeit absolvierten die Versuchstiere neun Einheiten auf dem Laufband (jeweils Montags, Mittwochs und Freitags). Vor dem ersten Ausdauerterest wurden die Mäuse für eine kurze Gewöhnung bei steigender Geschwindigkeit auf das Laufband gesetzt.

Der Ausdauerterest begann bei einer Geschwindigkeit von 15 cm/s. Die Geschwindigkeit erhöhte sich alle fünf Minuten um 5 cm/s bis zu einer Maximalgeschwindigkeit von 40 cm/s. Die Tiere liefen bei einer Abwärtsneigung von 5°. Eine Laufbandeinheit dauerte insgesamt 30 Minuten. Die komplette Distanz betrug 495 Meter. (siehe Abb. 4). Am hinteren Ende des Laufbandes erhielten die Mäuse geringfügige Stromstöße (0,4 mA), um sie zum Weiterlaufen anzuregen. Die Belastung wurde abgebrochen, sollte eine Maus insgesamt 30 Sekunden geschockt worden sein oder 200 Schocks erhalten haben. Falls eine Maus trotz der Stromstöße nicht weiterlief, wurde dies als generelles Erschöpfungszeichen gewertet und der Versuch sofort beendet. Für jede Belastungseinheit wurde die Gesamtdistanz ermittelt, die jedes Tier zurückgelegt hatte, bevor der Versuch abgebrochen wurde. Nach jeder Belastung wurden die Tiere für 30 Minuten beobachtet.

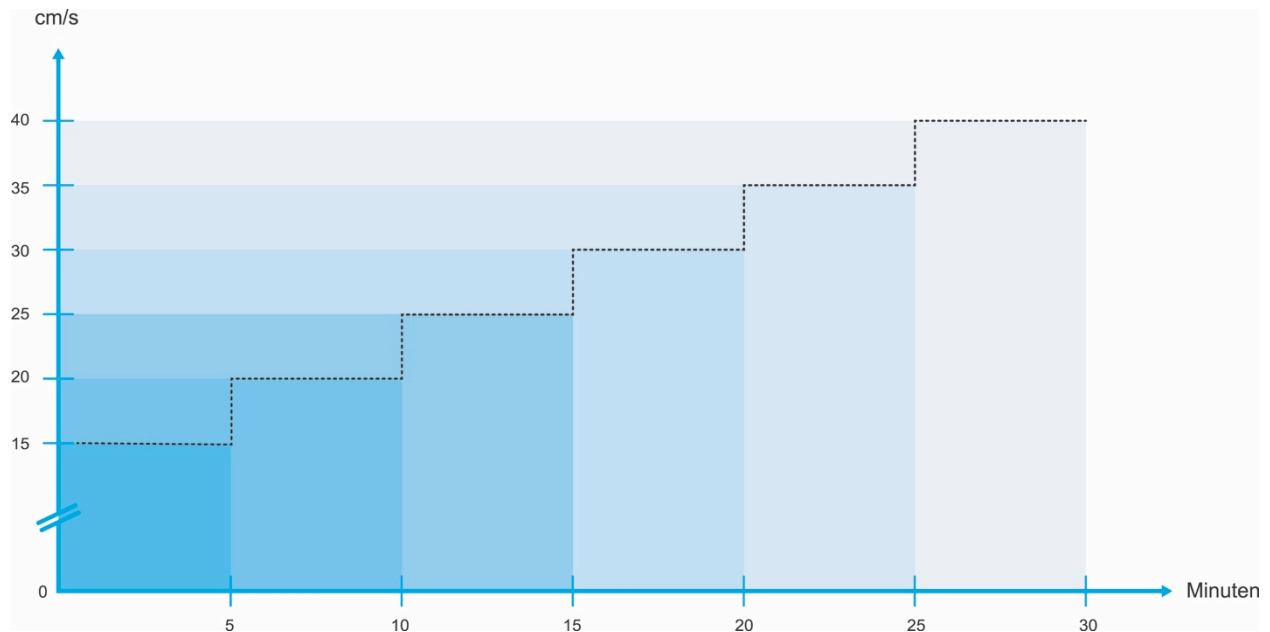


Abb. 4 - Laufbandprotokoll: Graphische Darstellung

4.6 Histologie

4.6.1 Biopsie Aufarbeitung

Die frisch präparierten Muskeln wurden mit *Gum Tragacanth* auf Korkplättchen fixiert, für zehn Sekunden in halbgefrorenem Isopentan geschwenkt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bei -80 °C aufbewahrt.

4.6.2 Schnitte

Die Gewebelöcke wurden mit dem Cryostat in 6 µm dünne Proben geschnitten und auf Deckgläschen fixiert. Pro Gewebelöcke wurden zwanzig Schnitte angefertigt und diese bei -20 °C aufbewahrt.

4.6.3 Färbungen

Die verschiedenen Lösungen der einzelnen Färbungen können der Materialliste entnommen werden.

4.6.3.1 Trichrom

Die Trichrom-Färbung eignete sich als Übersichtsfärbung für Muskelschnitte. Sie kombiniert eine Plasmafärbung mit einer Bindegewebsfärbung.

Die Schnitte wurden zunächst in gefiltertem *Gill's Hematoxylin* für fünf Minuten gefärbt. Anschließend wurden sie gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden dann für 10 Minuten in *Gomori's Trichrome* gefärbt und im Anschluss in Eisessig (0,25 %) gespült. Es folgte die schnelle Dehydrierung in 95 %igem und 100 %igem Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol fixiert und mit *Vitro-Clud* auf Objektträgern eingedeckelt.

Die Muskelfasern stellen sich grünlich dar, Kerne erscheinen rot, des Weiteren lassen sich Kollagen, Nervenscheiden, Axone und interstitielles Gewebe beurteilen (79).

4.6.3.2 Kongorot

Die Kongorot-Färbung diente der Darstellung von amyloiden Formationen. Die Azo- und Aminogruppen des Farbstoffes können mit den Kohlenhydrat-Hydroxyl-Radikalen des Amyloids eine Bindung eingehen und diese dadurch sichtbar darstellen.

Die Schnitte wurden zunächst für 30 Sekunden in modifiziertem *Mayer's Hematoxylin* gefärbt und daraufhin mit destilliertem Wasser gespült. Die Negativkontrollen wurden für zehn Minuten bei 37 °C mit der Arbeitslösung 1 inkubiert, anschließend dreifach in Ethanol dehydriert und in Xylol geklärt. Die restlichen Schnitte wurden in der Arbeitslösung 2 für 20 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt und ebenso dehydriert und geklärt. Die Schnitte wurden mit *Vitro-Clud* auf Objektträgern fixiert

In polarisierendem Licht erscheinen die Amyloidablagerungen leuchtend grün, in fluoreszierendem Licht stellen sie sich hellrot dar (80).

4.6.3.3 Lipid-Färbung Öl-Rot

Die Färbung von Lipideinlagerungen nutzt die Eigenschaft, dass die Löslichkeit des Farbstoffes in Lipiden höher ist als im Lösungsmittel und daher Fette angefärbt werden können.

Die Schnitte wurden für zehn Minuten in Formalin (10 %) fixiert, mit destilliertem Wasser gereinigt und in der Öl-Rot-Arbeitslösung für 15 Minuten gefärbt. Der Hintergrund wurde durch Eintauchen in Isopropylalkohol (60 %) geklärt. Nach erneutem

Waschen in destilliertem Wasser wurden die Zellkerne mit *Gill's Hematoxylin* angefärbt. Es folgte weiteres Waschen und Aktivierung des Farbstoffes durch Lithiumcarbonat (0,5 %). Die Schnitte wurden zuletzt unter laufendem Wasser gespült und mit *Kaiser's Glycerin Gelatine* eingebettet. Lipideinlagerungen können rot dargestellt werden, die Zellkerne erscheinen blau (81).

4.6.4 Mikroskopische Auswertung

4.6.4.1 Dystrophie-Merkmale

Gezählt wurden die Anzahl von nekrotischen Fasern, regenerierenden Fasern und Fasern mit zentralisiertem Zellkern im gesamten Muskelquerschnitt und der Anteil pro 100 Fasern berechnet. Des Weiteren wurde nach Entzündungen, Faseratrophie und Amyloidablagerungen gesucht.

4.6.4.2 Faserdurchmesser

Der Faserdurchmesser wurde im M. quadriceps gemessen. Hierzu wurden Bilder der gefärbten Muskelschnitte in 20-facher Vergrößerung angefertigt. Mit dem Programm *Image-J* (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA) wurde die Länge des größten Abstandes der sich am nächsten liegenden Faserseiten bestimmt. Pro Muskel wurden in etwa 100-150 Fasern gemessen.

4.7 Messung der Körperzusammensetzung

Um vergleichbare Werte zu erhalten wurde die Messung der Körperzusammensetzung nach fünf Stunden Nüchternheit durchgeführt. Mit dem *Minispec LF90 II* (Bruker Optics, Ettlingen, Deutschland) wurden folgende Parameter erhoben:

- Gesamtkörpergewicht in Gramm
- Freie Körperflüssigkeit in %
- Fettgewebe in %
- Fettfreie Masse in %

Die Messung als solche war für das Tier schmerzfrei und dauerte weniger als zwei Minuten. Sie wurde daher ohne Betäubung durchgeführt. Im Anschluss durften die

Tiere ad libidum Nahrung zu sich nehmen. Diese Messungen wurden durch die Pathophysiologie Plattform des Max-Delbrück-Centrums, Berlin durchgeführt.

4.8 Membranreparatur nach Laserschädigung der Muskelmembran

Dieses Verfahren wurde zur Beurteilung der Fähigkeit zur Membranreparatur von isolierten Muskelfasern eingesetzt. Das Protokoll wurde von Marg et al. 2012 in unserem Labor anhand der Vorlage von Bansal et al. entwickelt und optimiert (16, 82). Untersucht wurden Muskelfasern des M. flexor digitorum brevis. Dies ist ein dreibäuchiger Muskel der Fußsohle der für die Flexion der zweiten bis fünften Zehe zuständig ist. Nach Präparation wurde der Muskel bei 37 °C für 3 Stunden in *Minimum Essential Medium* (MEM) mit fetalem Kälberserum (FCS, 10 %) und Kollagenase 1 verdaut. Anschließend wurde der Muskel unter dem Mikroskop von Sehnen, Blutgefäßen und Überstand getrennt und die Muskelfaserbündel vorsichtig mit Pinzetten grob voneinander gelöst. Durch Pipettieren mit kleiner werdender Pipettenöffnung wurden einzelne Fasern aus den Faserbündeln gelöst. Die Fasern wurden über Nacht in *Complete MEM* (MEM mit FCS (10 %) und Gentamycin) auf Laminin-beschichteten AFM-Schalen fixiert.

Die Fasern wurden mit *Complete MEM* und Tyrode-Lösung gewaschen. Im Anschluss wurde der Farbstoff (2,5 µM FM 1-43 in Tyrode-Lösung) zu den Muskelfasern auf die AFM-Schalen gegeben. Für die kalziumhaltigen Versuche wurde der Lösung zusätzlich 2,5 mM Kalzium hinzugefügt.

Das Beschädigen der Zellmembranen erfolgte mittels Laser-Mikroskop (*Zeiss LSM 700, HXP 120*). Auf Grund von Hyperkontraktion oder Beschädigung der Faserhülle bei der Vorbereitung konnten nicht alle Fasern untersucht werden. Nur gut haftende, lang gestreckte Fasern, die vor dem Versuch keinen fluoreszierenden Farbstoff aufgenommen haben, konnten verwendet werden.

Es wurde eine kernfreie gerade Region der Membran gewählt. Durch Bestrahlen eines Areals in der Größe von 5 x 5 µm mit allen vier Lasern auf höchster Leistungsstufe, also insgesamt 30 mW wurde die Muskelmembran beschädigt und fluoreszierender Farbstoff konnte gegebenenfalls in die Zelle eindringen. Alle 20 Sekunden wurde der beschädigte Bereich bildlich festgehalten und die Intensität des Farbstoffes in einem Quadrat mit 10 µm Seitenlänge unmittelbar unterhalb des Bereiches der bestrahlten Membran gemessen (siehe Abb. 5). Als Nullwert galt der Farbstoffgehalt der Zelle vor

Beginn der Laserbestrahlung. Zur Auswertung wurde das Programm *Image-J* verwendet (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA).

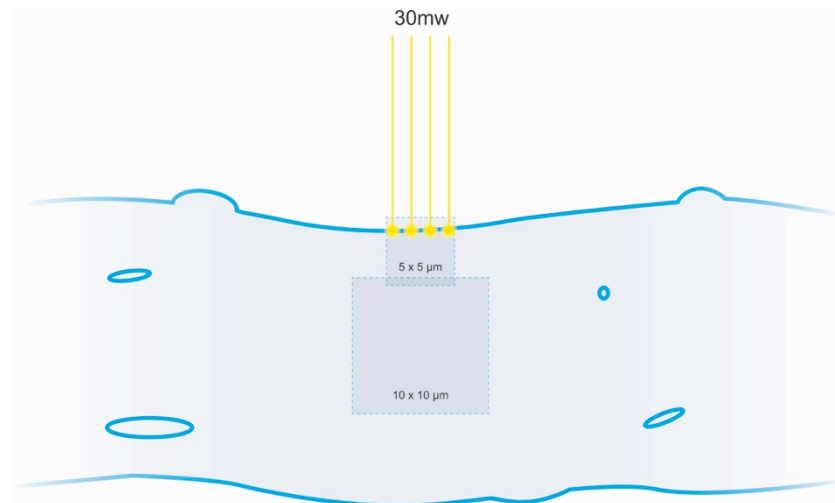


Abb. 5- Laser Schädigung der Fasermembran: Schematische Darstellung

4.9 Ketogene Diät

Um den Einfluss des Glukosehaushalts auf die Muskelatrophie zu beurteilen, wurden die Mäuse im Alter von zwölf Wochen über einen Zeitraum von acht Wochen strikt ketogen ernährt. Mit zwölf Wochen konnten bei den MMex38-Mäusen bereits histologische Veränderungen beobachtet werden. Im Alter von zwanzig Wochen waren sie noch stärker ausgeprägt. Ab der 17. Lebenswoche der Tiere wurde parallel der Ausdauerstest mit dem Laufband durchgeführt. Da für diesen Versuch zuvor nur männliche Versuchstiere verwendet wurden, bestand die ketogen-ernährte Versuchsgruppe ausschließlich aus männlichen Mäusen. Nach vorheriger Messung der Körperzusammensetzung und Abschluss des Laufbandprotokolls wurden die Tiere im Alter von zwanzig Wochen präpariert (siehe Abb. 6).

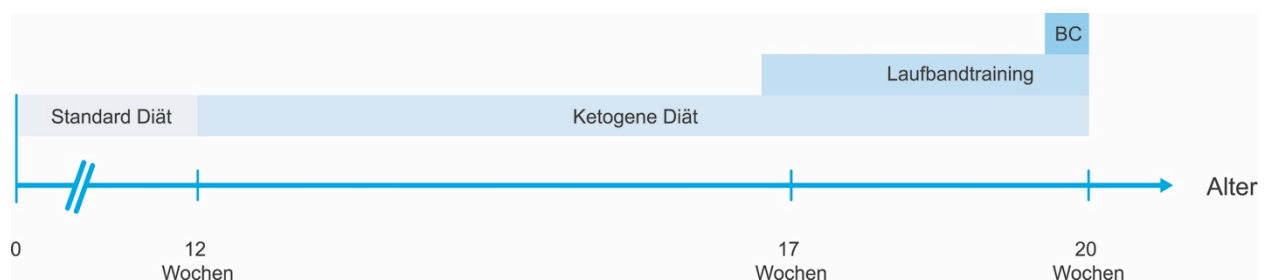


Abb. 6 – Ketogene Diät: Versuchsabfolge, BC: Body Composition (Messung der Körperzusammensetzung)

Der mögliche therapeutische Effekt der ketogenen Diät auf die Progredienz der Erkrankung wurde anhand folgender Parameter evaluiert:

1. Durchführung des Protokolls des Ausdauertests mit dem Laufband um phänotypische Veränderungen aufzeigen zu können.
2. Messung der Körperzusammensetzung im Alter von 20 Wochen unmittelbar vor der Tötung.
3. Histologische Auswertung pathologischer Parameter in der Skelettmuskulatur analog zu den Untersuchungen in den standardernährten Tieren.

4.9.1 Zusammensetzung der Nahrung

Im Vergleich zum Futter, welches die Tiere standardmäßig erhielten, bestand die ketogene Diät hauptsächlich aus Fetten, nahezu keinen Kohlehydraten und reduziertem Proteinanteil (siehe Tab. 3).

Tab. 3 – Ketogene Diät: Zusammensetzung des Futters

	Standardfutter	Ketogene Diät
Kohlenhydrate	60 %	3,2 %
Fette	4,5 %	75,1 %
Proteine	22 %	8,6 %
Rohfasern	3,9 %	4,8 %
Rohasche	6,8 %	3,0 %
Sonstiges	Mineralstoffe, Vitamine, Spurenelemente	Mineralstoffe, Vitamine, Spurenelemente, Wasser

Das ketogene Futter wurde gemäß Vorpublikationen (83) mit Salz und Vitaminpräparaten (siehe Tab. 4) angereichert, wobei es zu keinen unerwünschten Wirkungen bei mehrwöchiger Verabreichung gekommen ist.

Tab. 4 – Ketogene Diät: Nahrungsinhalte des Futters

	Standardfutter	Ketogene Diät
Inhaltsstoffe	Getreide und Getreidenebenprodukte, Ölsaatprodukte, Mineralstoffe, Bierhefe, pflanzliche Öle, Vitamine, Spurenelemente	Butter, Ölsaatprodukte, Casein, Zellulose, Mineral-Mix, Vitamin-Mix, Dextrose

4.10 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, Californien, USA) verwendet.

Die Einteilung der Gruppen erfolgte je nach Genotyp (Wildtyp oder MMex38), Alter (12, 20 oder 60 Wochen) und Art der Ernährung (Standard oder ketogen).

Vor Durchführung der Versuche wurde durch einen externen Statistiker (Dr. Andreas Busjahn, HealthTwiSt GmbH, Berlin) eine Fallzahlanalyse durchgeführt. Für die histologischen Untersuchungen und den Ausdauerstest mit dem Laufband wurde die erforderliche Größe der Gruppen bei N=6 festgelegt.

Der Vergleich der Gruppen untereinander erfolgte beim Vorliegen einer Normalverteilung mit Hilfe des t-Tests. Dieser wurde angewandt für die Berechnung der Signifikanz für die Messung der Körperzusammensetzung und die Auswertung für die Membranschädigung mittels Laser. Für die Auswertung der Laufdistanzen wurde der Mann-Whitney U-Test angewandt. Für die statistische Berechnung der histologischen Parameter konnte der t-Test für die Anzahl der regenerierenden Fasern und die Fasern mit zentralisierten Zellkernen verwendet werden. Bei der Anzahl der Nekrosen lag keine Normalverteilung der Gruppen vor. In keiner der Wildtyp-Kontrollen konnten Nekrosen gefunden werden. Daher wurden die Gruppen hier mittels Mann-Whitney U-Test verglichen. Das Signifikanzniveau wurde als $p < 0,05$ festgelegt. Dargestellt wurden stets Mittelwert und Standardfehler

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungsgruppen

Die Zuteilung der Mäuse zur MMex38-Gruppe erfolgte durch positiven Nachweis der o.g. homozygoten Mutation im Dysferlingen. Zum Ausschluss von Einflussfaktoren, die auf den genetischen Hintergrund der Tiere zurückzuführen gewesen wären, wurden die gesunden Wurfgeschwister der Versuchstiere als Wildtyp-Kontrollen verwendet.

Zur Darstellung verschiedener Stadien der progressiven Erkrankung wurden Tiere im Alter von zwölf, zwanzig und sechzig Wochen untersucht. Neben der Auswertung der Muskelhistologie wurden verschiedene Protokolle zur Bestimmung der Muskelfunktionalität, Muskelphysiologie und Muskelausdauer durchgeführt.

Folgende Versuchsgruppen wurden untersucht:

Tab. 5: Versuchsgruppen

	Alter (Wochen)	Genotyp	Laufband	Ernährung
1.	12	Wildtyp	Ja	Standard
2.	12	MMex38	Ja	Standard
3.	20	Wildtyp	Ja	Standard
4.	20	MMex38	Ja	Standard
5.	20	Wildtyp	Ja	Ketogen
6.	20	MMex38	Ja	Ketogen
7.	60	Wildtyp	Nein	Standard
8.	60	MMex38	Nein	Standard

Auf Grund unterschiedlicher Wurfzeiten sowie heterozygoter Verpaarung der Tiere waren die Versuchsgruppen unterschiedlich groß. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe wurde für die verschiedenen Untersuchungen einzeln angegeben.

5.2 Western Blot

Mittels Western Blot konnte eine deutlich reduzierte Menge an Dysferlin im M. quadriceps und M. tibialis anterior der MMex38-Tiere nachgewiesen werden (siehe Abb. 7). Der Nachweis von α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

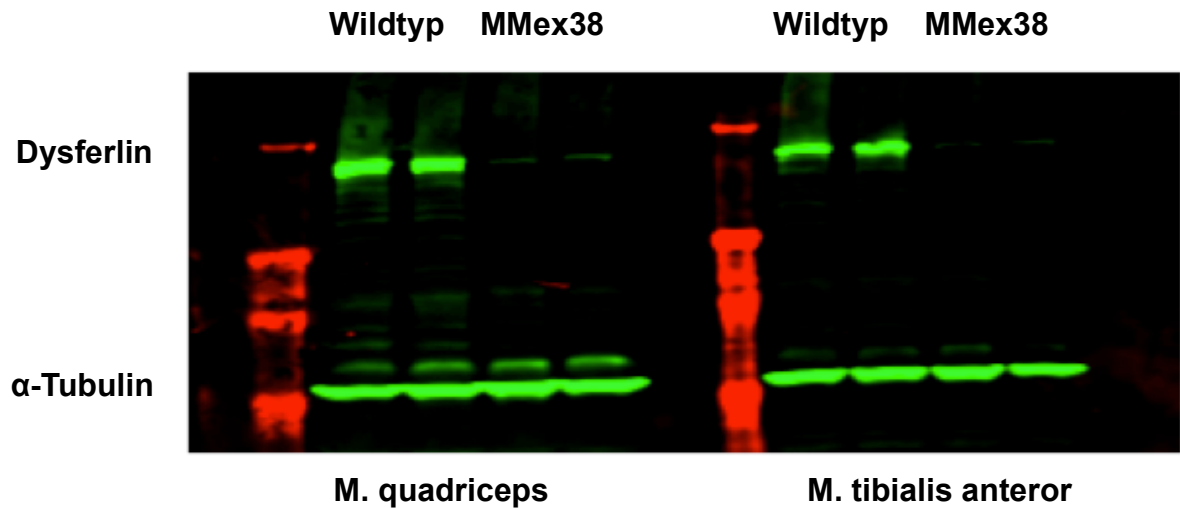


Abb. 7 - Western Blot: 12 Wochen alte Tiere, Anti-Dysferlin-Antikörper.: *Sigma aldrich*: „Hamlet“, murin, monoklonal, Anti- α -Tubulin Antikörper als Ladekontrolle: *Sigma aldrich*, murin, monoklonal

5.3 Antikörper-Färbung

Durch Antikörper-Färbung konnte in den Muskelfasern der MMex38-Tiere kein Dysferlin detektiert werden. Bei den Wildtyp-Kontrollen hingegen zeigte sich der physiologische Nachweis des Dysferlins entlang der Muskelfasermembran (siehe Abb. 8).

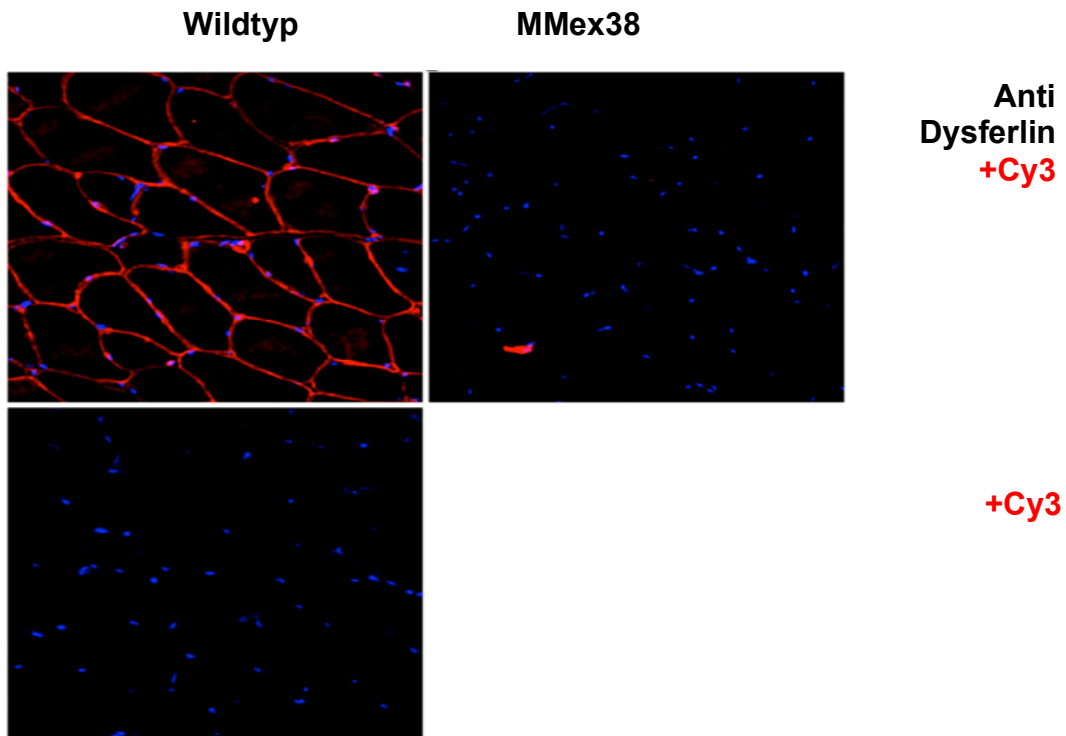


Abb. 8 - Antikörper-Färbung: M. tibialis anterior, 12 Wochen alte Tiere, Anti-Dysferlin Antikörper: Romeo, Kaninchen, monoklonal

5.4 Ausdauerterest mit dem Laufband

Der Ausdauerterest mit dem Laufband diente der Einschätzung der Muskelfunktion im Tiermodell. Um Differenzen auf Grund von Geschlechterunterschieden zu vermeiden, wurden für den Ausdauerterest mit dem Laufband ausschließlich männliche Tiere untersucht. Folgende Versuchsgruppen haben das Laufbandprotokoll absolviert:

- 12 Wochen alte, Wildtyp-Kontrollen (Gruppe 1)
- 12 Wochen alte, MMex38-Mäuse (Gruppe 2)
- 20 Wochen alte, Wildtyp-Kontrollen (Gruppe 3)
- 20 Wochen alte, MMex38-Mäuse (Gruppe 4)
- 20 Wochen alte, ketogen-ernährte Wildtyp-Kontrollen (Gruppe 5)
- 20 Wochen alte, ketogen-ernährte MMex38-Mäuse (Gruppe 6)

Für jede Belastungseinheit (Tag 1-9) wurde für jedes Versuchstier die Laufdistanz bis zum Abbruch bzw. Abschluss des Protokolls ermittelt (siehe Tab. 6, Tab. 7).

Tab. 6 - Laufdistanzen: Rohdaten der zurückgelegten Laufdistanz der 20 Wochen alten Wildtyp-Versuchsgruppe für jeden Tag mit Belastungseinheit, sowie der Mittelwert der Laufdistanz aller Tiere für Laufbandwoche 1 (Tag 1-3) und Laufbandwoche 3 (Tag 7-9). Angabe in Metern.

	Wildtyp 1	Wildtyp 2	Wildtyp 3	Wildtyp 4	Wildtyp 5	Wildtyp 6	Wildtyp 7	Wildtyp 8	
Tag 1	495	495	495	495	495	495	495	455	
Tag 2	495	495	495	419	495	495	495	329,5	
Tag 3	391	495	495	240	495	495	495	357,5	
Tag 4	222	495	495	189	495	237	495	298	
Tag 5	207	483	495	147,5	495	267	495	326	
Tag 6	291	364,5	495	127,5	495	237	495	301,5	
Tag 7	210	387	495	189	495	261	495	195	
Tag 8	338,25	329,5	495	170	459	165	495	326	
Tag 9	329,5	298	407	122,5	411	234	495	249	
									Mittelwert Tag 1-3 alle Wildtypen
Mittelwert Tag 1-3	460,3	495	495	384,7	495	495	495	380,7	462,6
									Mittelwert Tag 7-9 alle Wildtypen
Mittelwert Tag 7-9	292,6	338,2	465,7	160,5	455	220	495	256,7	335,5

Tab. 7 – Laufdistanzen: Rohdaten der zurückgelegten Laufdistanz der 20 Wochen alten MMex38-Versuchsgruppe für jeden Tag mit Belastungseinheit, sowie der Mittelwert der Laufdistanz aller Tiere für Laufbandwoche 1 (Tag 1-3) und Laufbandwoche 3 (Tag 7-9). Angabe in Metern.

	MMex38 1	MMex38 2	MMex38 3	MMex38 4	MMex38 5	MMex38 6	
Tag 1	495	495	495	495	301,5	495	
Tag 2	495	459	495	280,5	137,5	495	
Tag 3	447	243	495	135	155	403	
Tag 4	411	192	495	122,5	93	207	
Tag 5	261	150	371	99	91	155	
Tag 6	301,5	157,5	193	145	89	243	
Tag 7	237	147,5	240	85	85	127,5	
Tag 8	198	132,5	201	115	57	198	
Tag 9	183	140	198	107,5	75	152,5	
							Mittelwert Tag 1-3 alle MMex38
Mittelwert Tag 1-3	479	399	495	303,5	198	464,3	389,8
							Mittelwert Tag 7-9 alle MMex38
Mittelwert Tag 7-9	206	140	213	102,5	72,3	159,3	148,9

In der Altersgruppe von zwölf Wochen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den MMex38-Mäusen und den Wildtyp-Kontrollen gezeigt werden. Sowohl in der MMex38-Gruppe als auch in der Wildtyp-Gruppe kam es im Verlauf zu einer kontinuierlichen Verschlechterung der Ausdauerleistung; In der dritten Woche des Laufbandprotokolls musste die Belastung bei einem Großteil der Versuchstiere auf Grund der oben genannten Abbruchkriterien vorzeitig beendet werden (siehe Abb. 9).

Im Alter von zwanzig Wochen gab es in Woche 1 keine signifikanten Unterschiede zwischen den MMex38- und den Wildtyp-Tieren. Die Wildtyp-Gruppe lief im Durchschnitt 442,6 m, die MMex38-Mäuse 389,8 m. Auch hier kam es innerhalb beider Gruppen zu einer signifikanten Abnahme des Laufvermögens im Verlauf; In der dritten Woche liefen die Wildtyp-Kontrolltiere im Mittelwert 335,5 m ($p < 0,001$), die MMex38-Tiere erreichten im Durchschnitt lediglich 149,9 m ($p < 0,0001$). In Woche 3 war die Laufleistung der MMex38-Gruppe im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe signifikant kürzer ($p < 0,0001$, siehe Abb. 9).

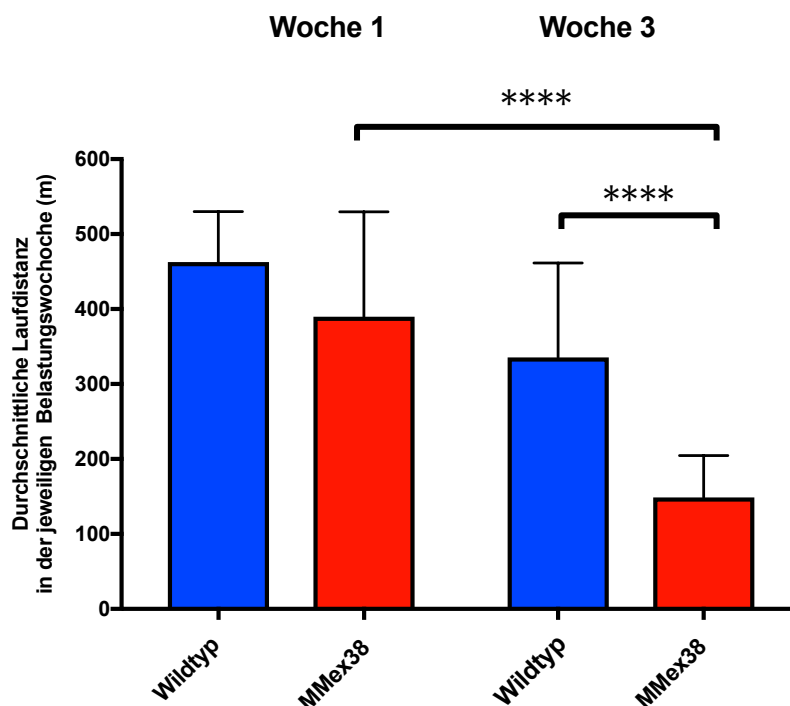


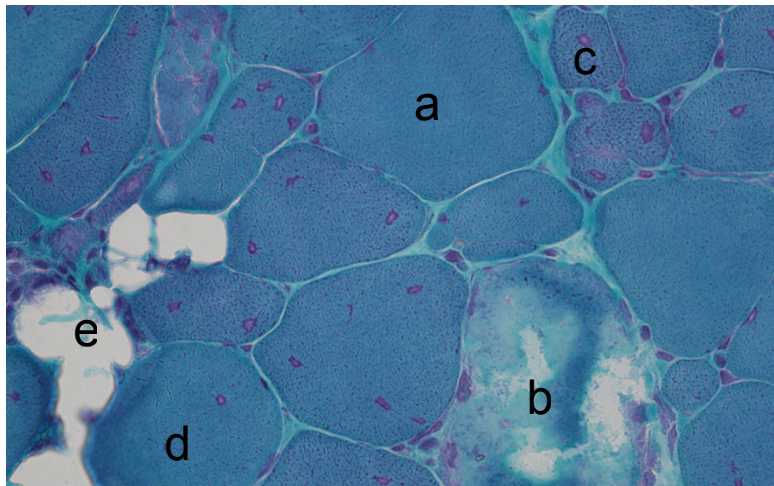
Abb. 9 – Laufdistanzen: Die durchschnittliche Laufdistanz der ersten und dritten Belastungswoche bei 20 Wochen alten MMex38-Mäusen (rot), N=6, im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (blau), N=8, Median \pm Quartilabstand, **** = $p < 0,0001$,

5.5 Histologie

Von allen Versuchstieren wurden histologische Färbungen des M. quadriceps und des M. tibialis anterior angefertigt. Der M. quadriceps ist als rumpfnaher Muskel bei der zu untersuchenden Erkrankung frühzeitig betroffen.

5.5.1 Gomori Trichrom-Färbung

Zeichen eines dystrophen Muskels sind, unter anderem, erhöhte Anzahl an regenerierenden Fasern, der Nachweis von nekrotischen Fasern und vermehrt Zellen mit zentralisierten Nuklei (siehe Abb. 10). Für die Auswertung der genannten Parameter wurde die Gomori Trichrom-Färbung verwendet.



- a) Unauffällige Faser
- b) Nekrotische Faser
- c) Regenerierende Faser
- d) Faser mit zentralisiertem Zellkern
- e) Adipozytärer Umbau

Abb. 10 - Trichrom-Färbung: Charakteristische Pathologien im histologischen Bild im murinen dysferlindefizienten M. quadricep

Abb. 11 demonstriert anhand des M. quadriceps von Kontrolltieren und MMex38-Mäusen die zunehmende Tendenz der pathologischen Veränderungen mit steigendem Alter.

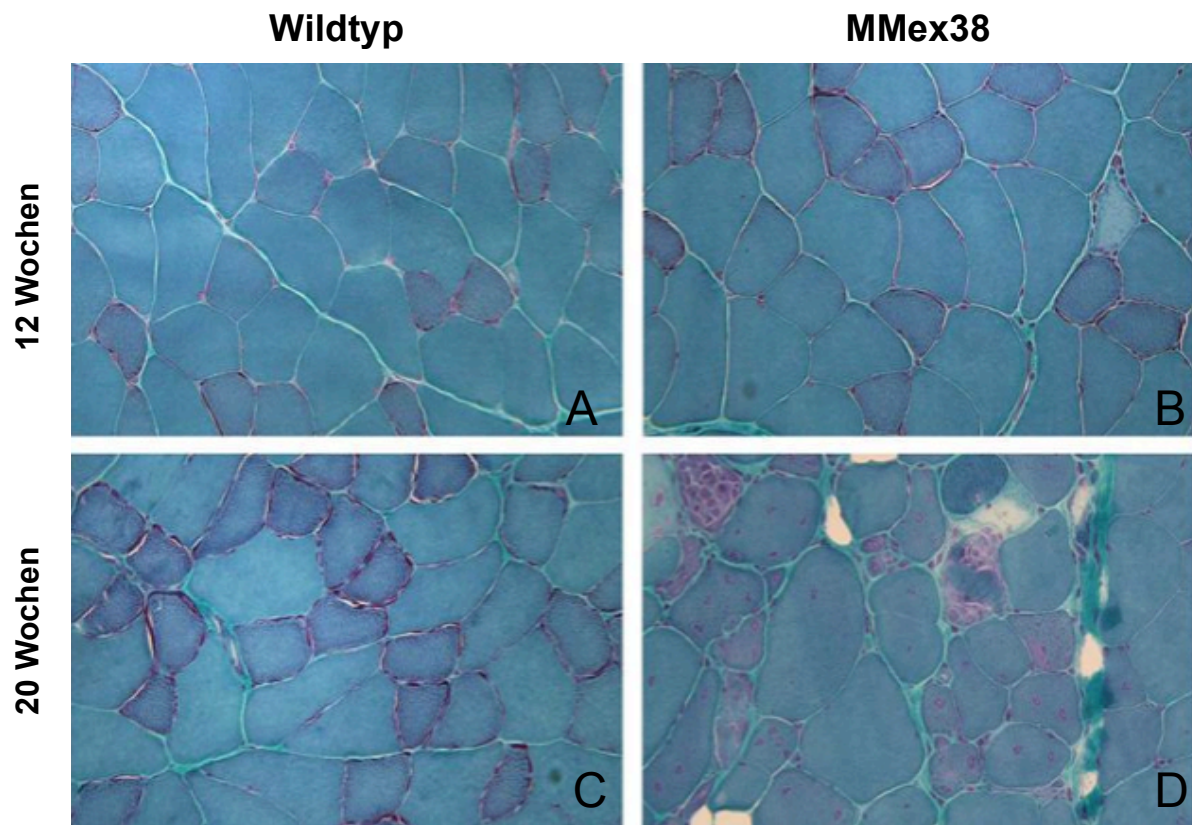


Abb. 11 – Trichrom-Übersicht: M. quadriceps in 20-facher Vergrößerung: A= 12 Wochen alte Wildtyp-Maus, B= 12 Wochen alte MMex38-Maus, C= 20 Wochen alte Wildtyp-Maus, D= 20 Wochen alte MMex38-Maus.

Bereits ab einem Alter von zwölf Wochen konnten im M. quadriceps der untersuchten MMex38-Mäuse im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Kontrollen vermehrt Nekrosen ($p < 0,005$), regenerierende Fasern ($p < 0,0001$) und Zellen mit zentralisiertem Zellkern nachgewiesen werden ($p < 0,005$). Diese Pathologien nahmen mit zunehmendem Alter entsprechend progredient signifikant zu (siehe Abb. 12).

Diese Histopathologie zeigte sich ab einem Alter von zwölf Wochen ebenso im M. tibialis anterior. Sowohl der Anteil der regenerierenden Fasern ($p < 0,005$), als auch der Anteil der Nekrosen ($p < 0,005$) und der Zellen mit zentralisiertem Zellkern ($p < 0,0001$) waren im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Im Alter von zwanzig Wochen nahmen auch hier die histopathologischen Veränderungen weiter zu (siehe Abb. 13).

Um die weitere Progredienz der Dysferlinopathie zu beurteilen, wurden sechzig Wochen alte MMex38-Mäuse untersucht. Diese Tiere hatten vor der Tötung nicht das Laufbandprotokoll absolviert, da die Anforderungen in diesem Krankheitsstadium als zu hoch eingestuft wurden. Die Tiere waren jedoch im Käfig mobil. Das histologische Bild der Muskeldystrophie zeigte sich in den sechzig Wochen alten MMex38 stärker

ausgeprägt und damit progredient (siehe Abb. 12 und Abb. 13). Zusätzlich zu den oben genannten Veränderungen konnten in einzelnen Proben auch Amyloidablagerungen sowie vermehrt intrazelluläre Lipideinlagerungen nachgewiesen werden (siehe 5.5.2 und 5.5.3).

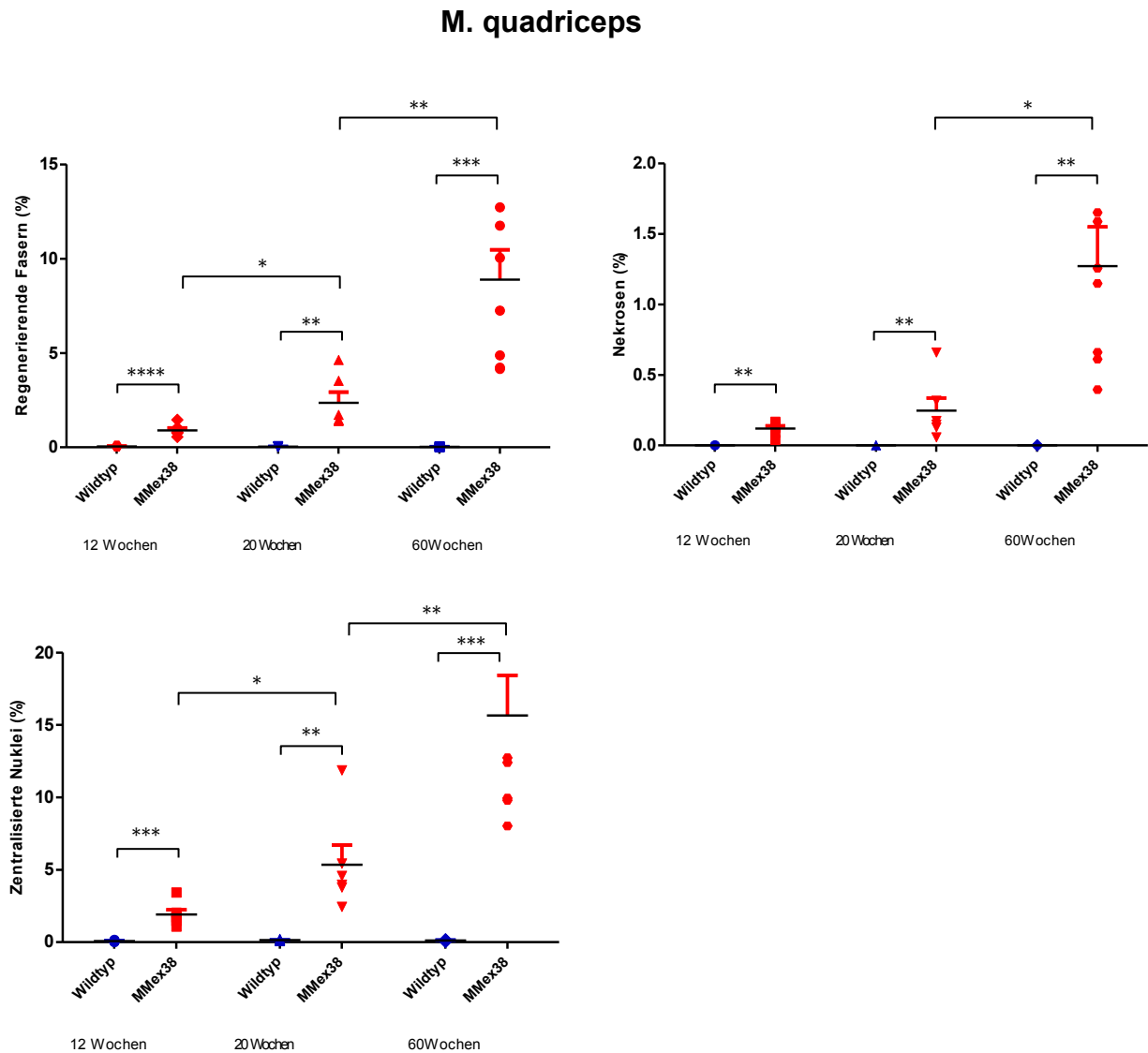


Abb. 12 - Histologie M. quadriceps: Anzahl der Nekrosen, regenerierenden Fasern und Fasern mit zentralisierten Nuklei im M. quadriceps von 12, 20 und 60 Wochen alten MMex38-Mäusen (rot) und Wildtyp-Kontrollen (blau), Wildtyp 12 Wochen: N=6, MMex38 12 Wochen: N=6, Wildtyp 20 Wochen: N=6, MMex38 20 Wochen: N=6, Wildtyp 60 Wochen: N=7, MMex38 60 Wochen: N=8, Mittelwert und Standardfehler, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, * = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$.**

M. tibialis anterior

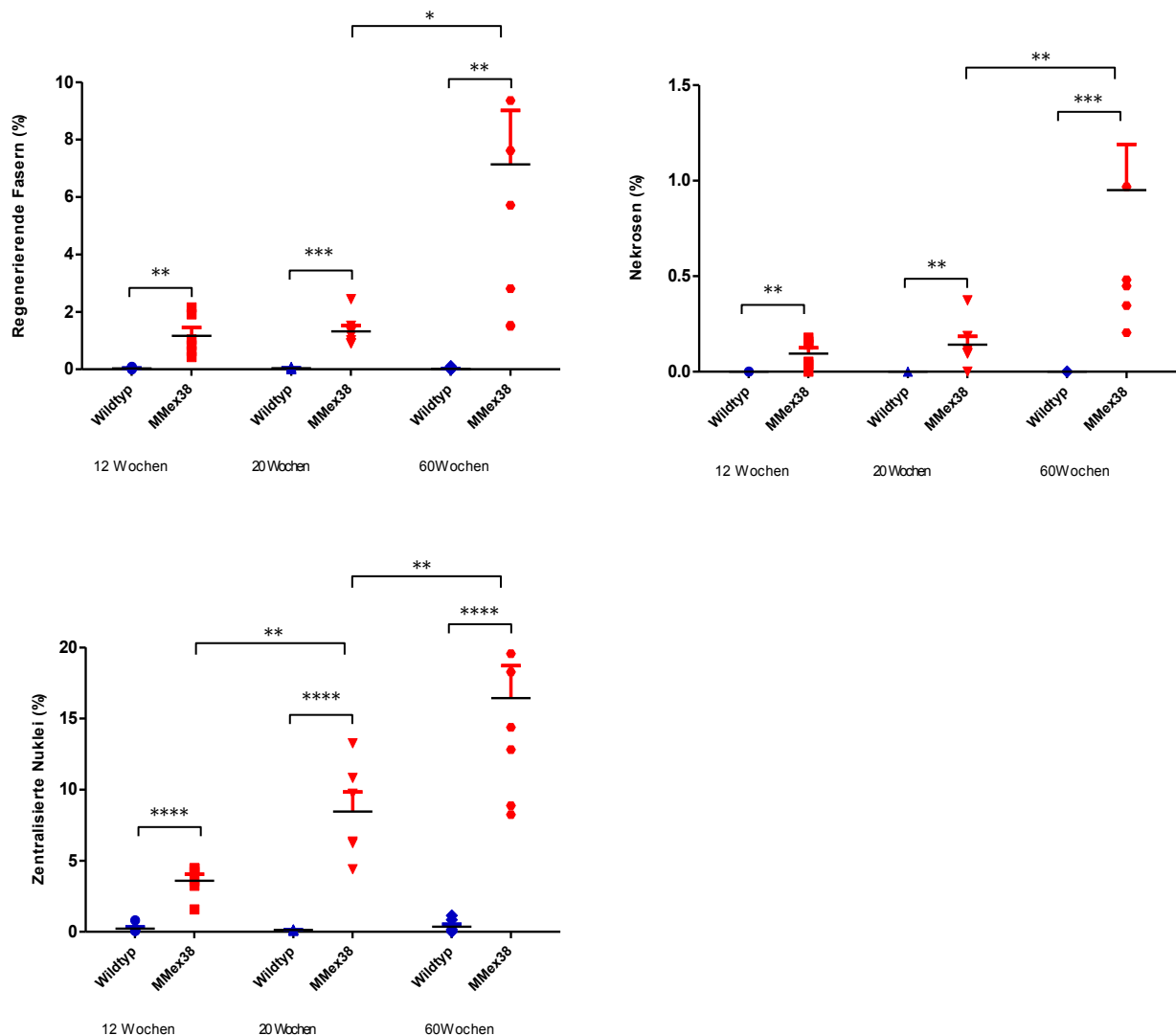


Abb. 13 – Histologie M. tibialis anterior: Anzahl der Nekrosen, regenerierenden Fasern und Fasern mit zentralisierten Nuklei im M. tibialis anterior von 12, 20 und 60 Wochen alten MMex38-Mäusen (rot) und Wildtyp-Kontrollen (blau), Wildtyp 12 Wochen: N=6, MMex38 12 Wochen: N=6, Wildtyp 20 Wochen: N=6, MMex38 20 Wochen: N=7, Wildtyp 60 Wochen: N=7, MMex38 60 Wochen: N=8 Mittelwert und Standardfehler, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, * = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$.**

5.5.2 Kongorot-Färbung

Amyloid beschreibt die Anreicherung von fehlerhaften und unlöslichen Proteinen im Interstitium. Diese fehlgefalteten Proteine gehen eine β -Faltblattstruktur ein und bilden kleine Fibrillen. Amyloid entsteht bei verschiedensten Erkrankungen, denen die Fehlfaltung eines zuvor löslichen Proteins zu Grunde liegt (84). Die Kongorot-Färbung

ist die allgemein gebräuchliche Färbung zum Nachweis von Amyloid (80). In dieser Färbung stellen sich die Amyloidablagerungen im Hellfeld rot dar.

Es wurde der M. quadriceps und der M. tibialis anterior von sechzig Wochen alten MMex38 und Wildtyp-Kontrollen untersucht. Im M. quadriceps konnte in fünf von neun Mäusen Amyloid nachgewiesen. Beim M. tibialis anterior wurde in vier von neun Mäusen Amyloid nachgewiesen. Vorrangig befanden sich die amyloiden Formationen perivaskulär, vereinzelt zeigten sich jedoch auch intrazelluläre Ablagerungen (siehe Abb. 14).

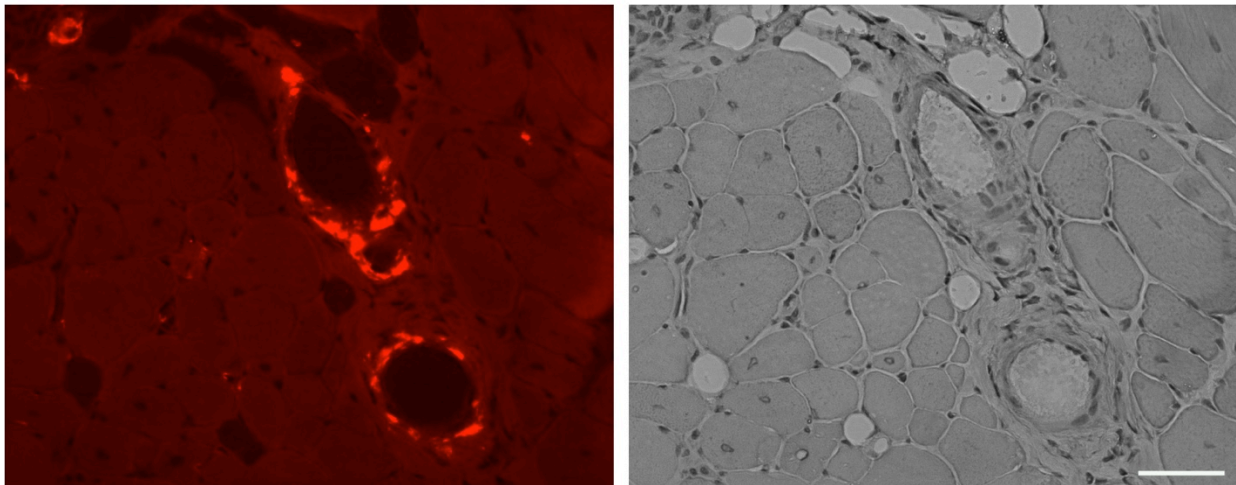


Abb. 14 - Kongorot-Färbung: MMex38-Maus, 60 Wochen alt, M. quadriceps. Zu sehen sind perivaskuläre Amyloid-Ablagerungen die im Hellfeld rot leuchten (Vergrößerung: Linie = 50 μ m)

5.5.3 Öl-Rot-Färbung

Die Färbung mit Öl-Rot dient der Darstellung von intrazellulären Lipidanreicherungen. Durch die hohe Fettlöslichkeit des Farbstoffes können Lipideinlagerungen angefärbt werden und stellen sich rot dar. In MMex38-Proben konnten vereinzelt intrazelluläre Lipideinlagerungen dargestellt werden. Eindrücklicher waren jedoch der Einbau von Adipozyten und damit der fettgewebige Umbau der gesamten Muskelfaser (s.o.).

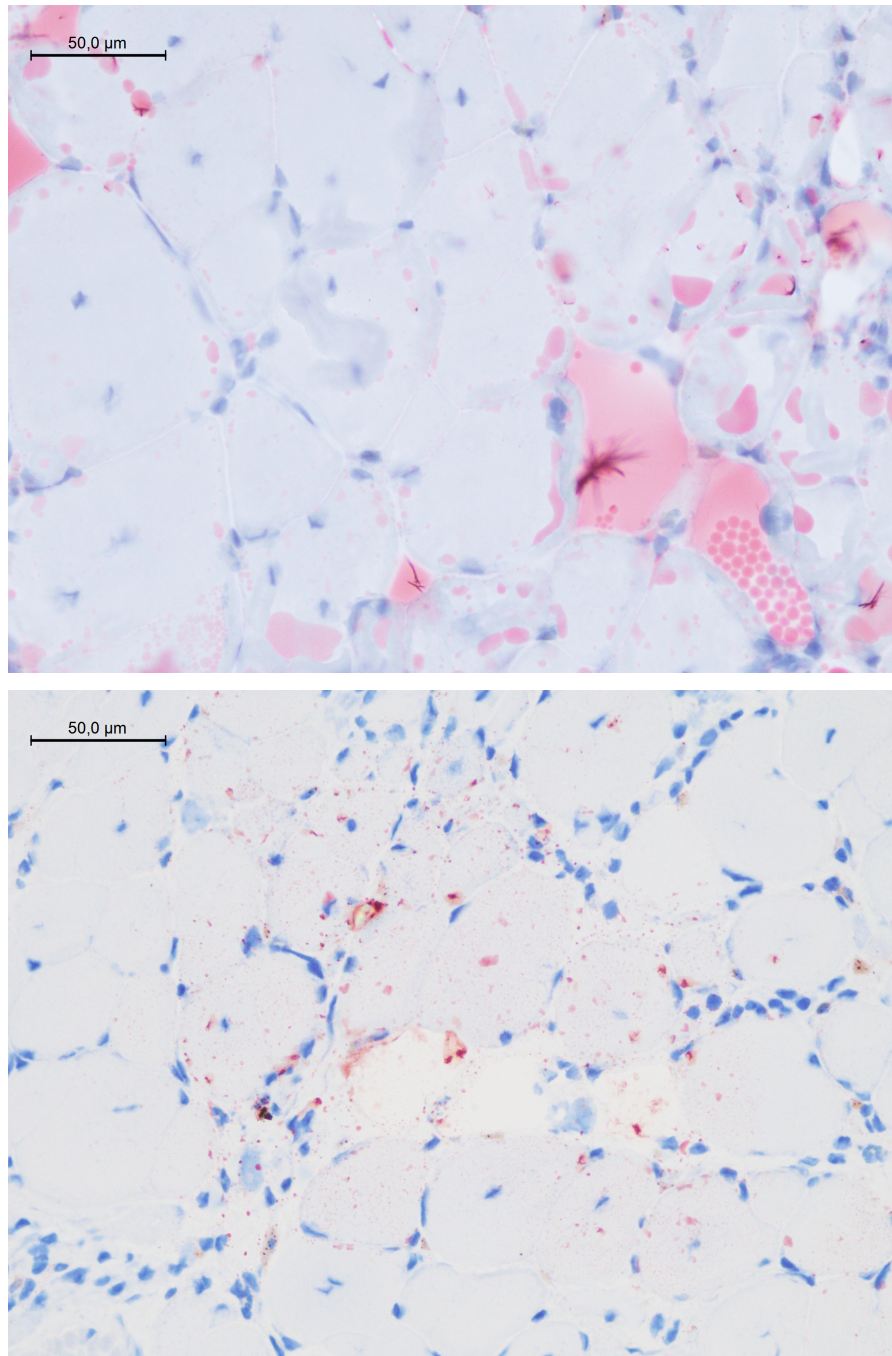


Abb. 15 - Öl-Rot-Färbung: M. quadriceps von 60 Wochen alten MMex38-Mäusen. Intrazelluläre Fetteinlagerungen lassen sich als kleine rote Tropfen erkennen.

5.5.4 Faserdurchmesser

Zur Bestimmung einer möglichen Muskelatrophie wurde der Faserdurchmesser der M. quadriceps untersucht. Bei einem gesunden Muskel besteht keine große Varianz des Durchmessers der einzelnen Muskelfasern, die Fasern sind je nach Anschnitt in etwa gleich groß. Bei den Wildtyp-Kontrollen lag der durchschnittliche Faserdurchmesser im Alter von zwanzig Wochen bei 50-70 µm. Bei den MMex38-Mäusen hingegen lediglich

bei 40-60 μm . Diese Linksverschiebung sowie die deutliche Varianz der einzelnen Fasergrößen sind Zeichen einer beginnenden Faseratrophie.

Bei der Betrachtung der MMex38-Mäuse im Alter von sechzig Wochen zeigte sich eine Progredienz der Atrophie. Der Durchschnitt des Faserdurchmessers lag lediglich bei 30-50 μm . Es fanden sich zudem stark atrophe Fasern mit einem Durchmesser von unter 10 μm (siehe Abb. 16 und Abb. 17).

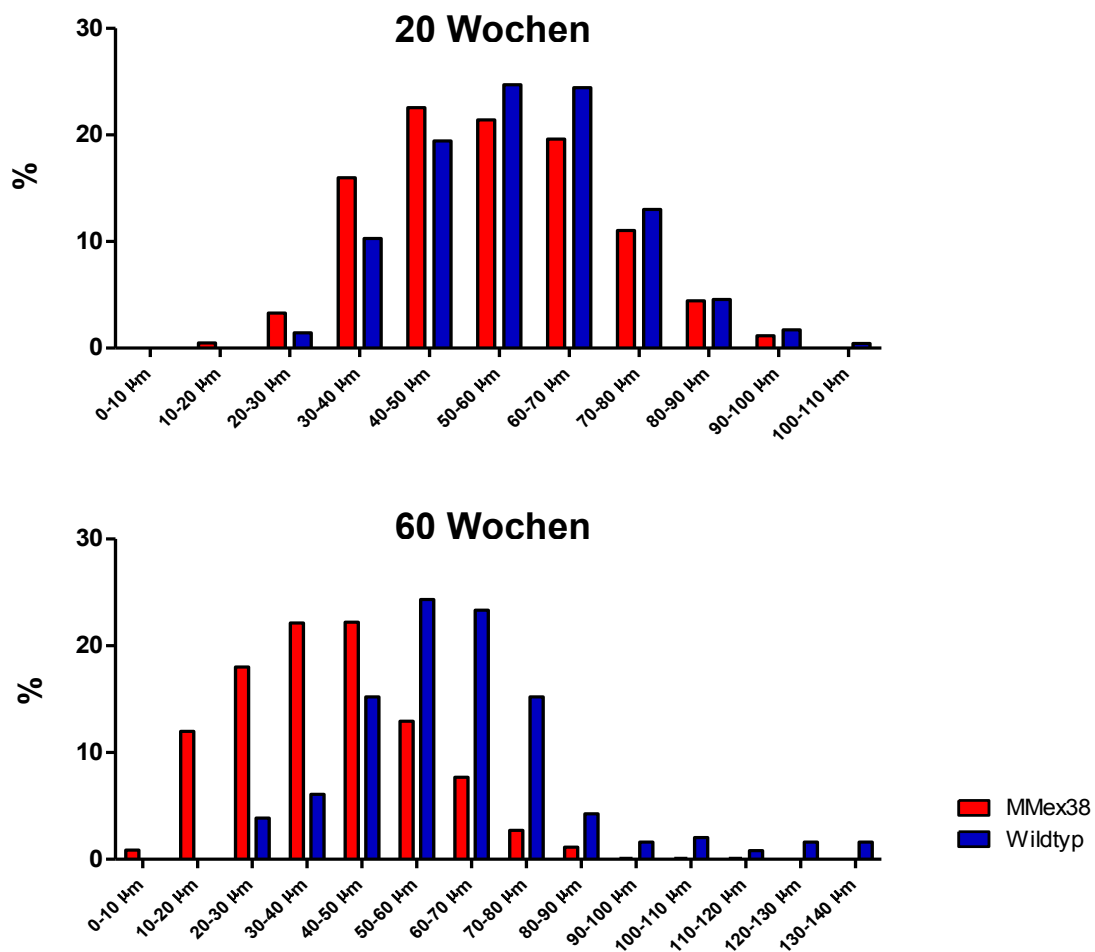


Abb. 16 – Verteilung des Faserdurchmessers: Prozentuale Verteilung des Faserdurchmessers des M. quadriceps in 20 Wochen alten (oben) und 60 Wochen alten (unten) MMex38-Mäusen (rot) und Wildtyp-Kontrollen (blau), N= >500 Fasern pro Gruppe, N= 4 Mäuse pro Gruppe.

Wildtyp

MMex38

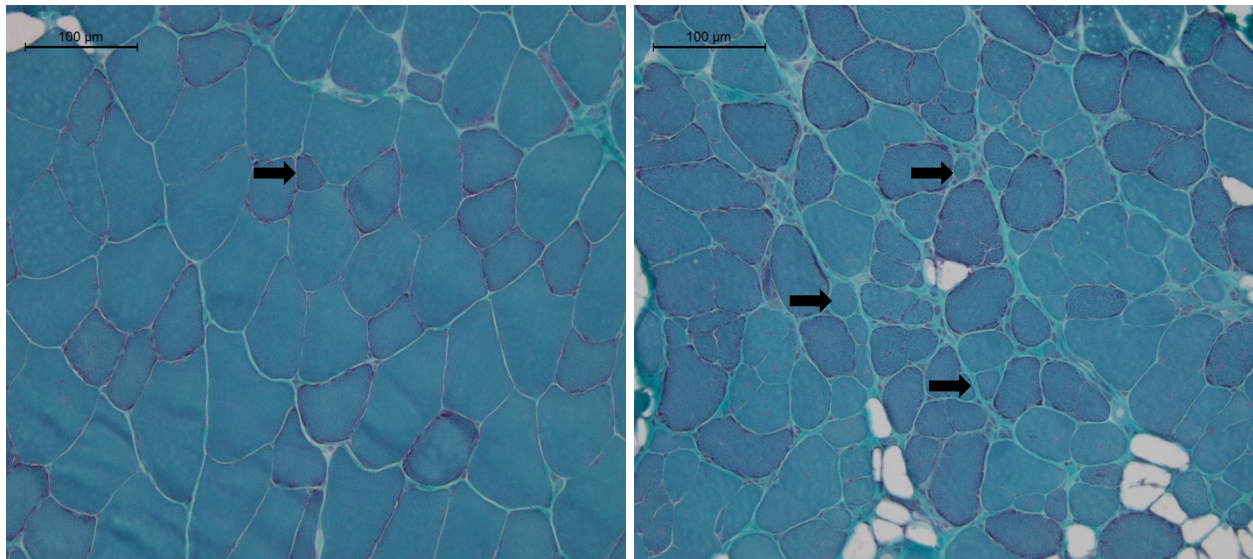


Abb. 17 - Thrichrom Färbung – Atrophien: M. quadriceps, links: 60 Wochen alte Wildtyp-Maus, rechts: 60 Wochen alte MMex38-Maus. Die Pfeilspitzen markieren beispielhaft atrophe Fasern.

Um ausschließen zu können, dass die Faseratrophie im MMex38-Mausmodell durch die Ausdauerbelastung induziert wurde, erfolgte die Auswertung des Faserdurchmessers in zwanzig Wochen alten MMex38-Tieren, die zuvor nicht das Laufbandprotokoll absolviert hatten. Dabei konnte keine vermehrte Faseratrophie durch die körperliche Belastung detektiert werden (siehe Tab. 8 - Prozentuale Verteilung des Faserdurchmessers in 20 Wochen alten MMex38. Vergleich zwischen Laufbandprotokoll und keiner vorherigen Belastung.).

Tab. 8 - Prozentuale Verteilung des Faserdurchmessers in 20 Wochen alten MMex38. Vergleich zwischen Laufbandprotokoll und keiner vorherigen Belastung.

	< 30 µm	30-40 µm	40-50 µm	50-60 µm	60-70 µm	70-80 µm	80-90 µm	> 90 µm
MMex38 <i>Laufband</i>	3,8 %	16,0 %	22,6 %	21,4 %	19,6 %	11,0 %	4,5 %	1,2 %
MMex38 <i>Kein Laufband</i>	1,4 %	10,3 %	19,4 %	24,7 %	24,4 %	13,0 %	4,6 %	2,1 %

5.6 Messung der Körperzusammensetzung

Die Messung der Körperzusammensetzung wurde in zwanzig und sechzig Wochen alten Tieren durchgeführt. Zwanzig Wochen alte MMex38-Mäuse hatten im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen ein erhöhtes Gesamtkörpergewicht ($p < 0,005$). Die Menge an fettfreier Masse hingegen war reduziert ($p < 0,05$). Des Weiteren wiesen MMex38-Tiere einen erhöhten Anteil freier Flüssigkeit auf ($p < 0,05$). Der Anteil der prozentualen Fettmasse zeigte keinen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 18 und Tab. 9). In sechzig Wochen alten Tieren gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen MMex38-Tieren und Wildtypen. Es zeigte sich ebenfalls keine signifikante Veränderung der Körperzusammensetzung der MMex38-Mäuse zwischen einem Alter von zwanzig und sechzig Wochen. Allerdings betrug die Anzahl der Mäuse für die Wildtypen $N=5$ und die MMex38-Mäuse $N=4$. Es ist anzunehmen, dass die Versuchsgruppen zu klein gewählt waren.

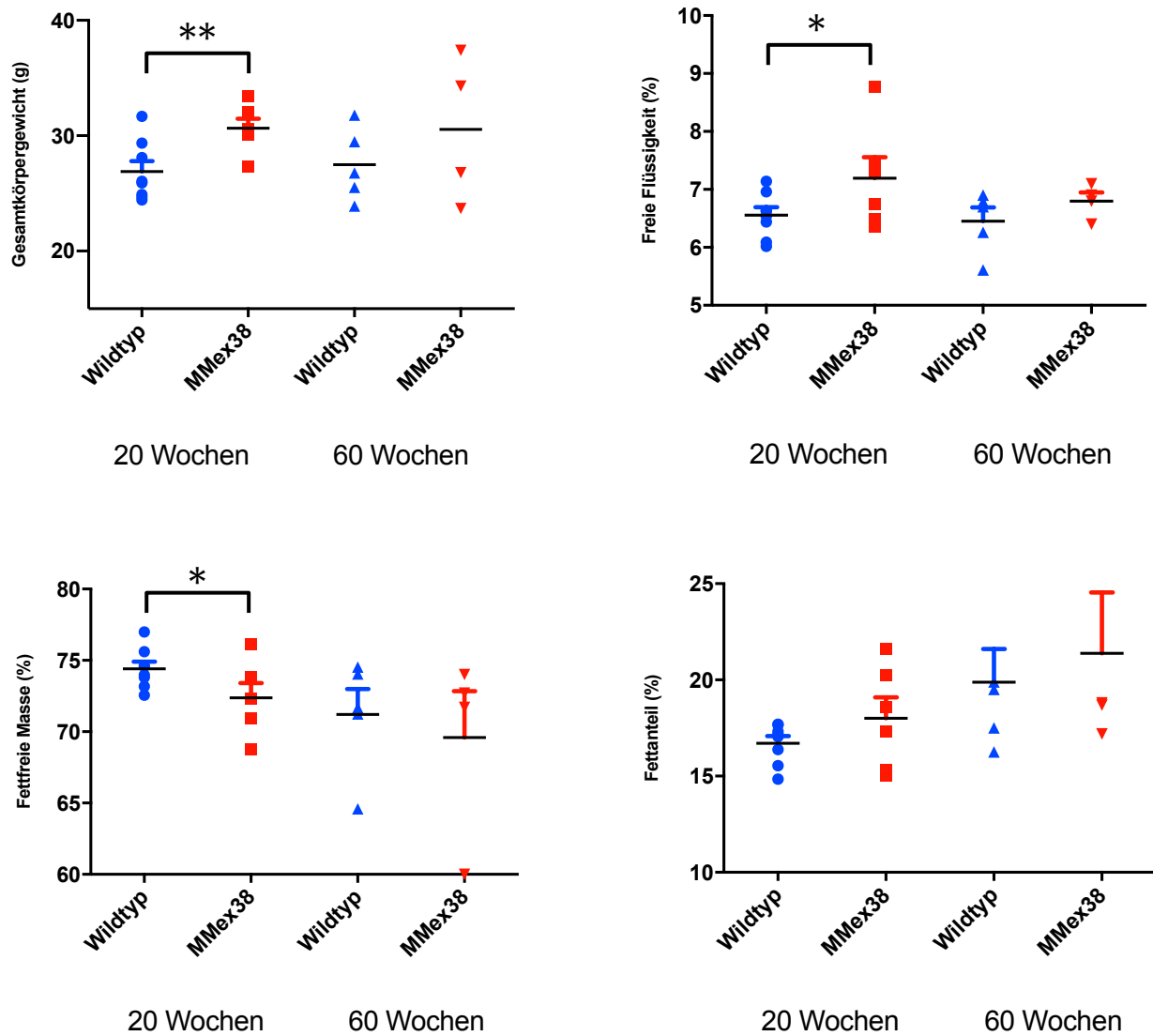


Abb. 18 – Körperzusammensetzung; 20 Wochen alte MMex38-Mäuse (rot) und Wildtyp-Kontrollen (blau), Wildtyp 20 Wochen: N=8, MMex38 20 Wochen: N=6, Wildtyp 60 Wochen: N=5, MMex38 60 Wochen: N=4, Mittelwert und Standardfehler, * = p < 0,05, ** = p < 0,005.

Tab. 9 - Körperzusammensetzung (Rohdaten): 20 und 60 Wochen alte Wildtyp-Mäuse (N=8) und MMex38-Mäuse(N=6) und Mittelwert.

		Alter (Wo)	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6	Maus 7	Maus 8	Mittelwert
Körpergewicht (g)	Wildtyp	20	25,9	29,35	26,05	24,67	31,67	24,9	24,44	28,1	26,90
		60	26,78	31,77	25,52	23,89	29,49				26,99
	MMex38	20	30,11	32,00	33,42	30,60	30,42	27,33			30,65
		60	34,30	23,70	26,80	37,40					28,20

Freie Flüssigkeit (%)	Wildtyp	20	6,96	6,09	6,63	6,54	6,44	6,63	6,02	7,14	6,56	
		60	6,26	5,61	6,70	6,79	6,90					6,34
	MMex38	20	6,36	8,77	7,47	6,49	7,32	6,75				7,19
		60	7,10	6,80	6,40	6,90						6,80
Fettanteil (%)	Wildtyp	20	17,05	17,32	6,38	17,17	15,54	17,70	14,85	17,67	16,71	
		60	19,89	17,51	16,26	19,51	26,25				18,29	
	MMex38	20	15,02	15,30	17,32	20,23	21,60	18,59			18,01	
		60	18,80	17,20	18,70	30,80					18,20	
Fettfreie Masse (%)	Wildtyp	20	73,81	74,61	74,58	73,98	75,61	73,18	76,99	72,56	74,42	
		60	71,67	74,04	74,52	71,24	64,60				72,87	
	MMex38	20	76,12	73,81	72,33	70,91	68,77	72,34			72,38	
		60	71,70	74,00	72,70	60,00					72,80	

Fettfreie Masse beschreibt alle Körperbestandteile, außer Fett und Flüssigkeit. Hierzu gehören demnach Bindegewebe, Organe und Muskulatur. Um genauer bestimmen zu können, ob die Muskelmasse in MMex38-Mäusen reduziert ist, wurde das Gewicht einzelner Muskeln erhoben. Untersucht wurden M. tibialis anterior und M. extensor digitorum longus, da diese Muskeln bei der Präparation gut am Muskel-Sehnen-Übergang abgetrennt werden können.

Bestimmt wurde der prozentuale Anteil des Muskelgewichts am Gesamtkörpergewicht. Im Alter von zwölf Wochen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wildtyp-Gruppe und der MMex38-Gruppe. In zwanzig Wochen alten Tieren war die Muskelmasse des M. tibialis anterior bei den MMex38-Mäusen reduziert ($p < 0,05$). Für den M. extensor digitorum longus konnte zwischen Wildtyp- und MMex38-Gruppe kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, es zeigte sich jedoch eine Abnahme der Muskelmasse zwischen den zwölf und zwanzig Wochen alten MMex38-Tieren ($p < 0,05$, siehe Abb. 19).

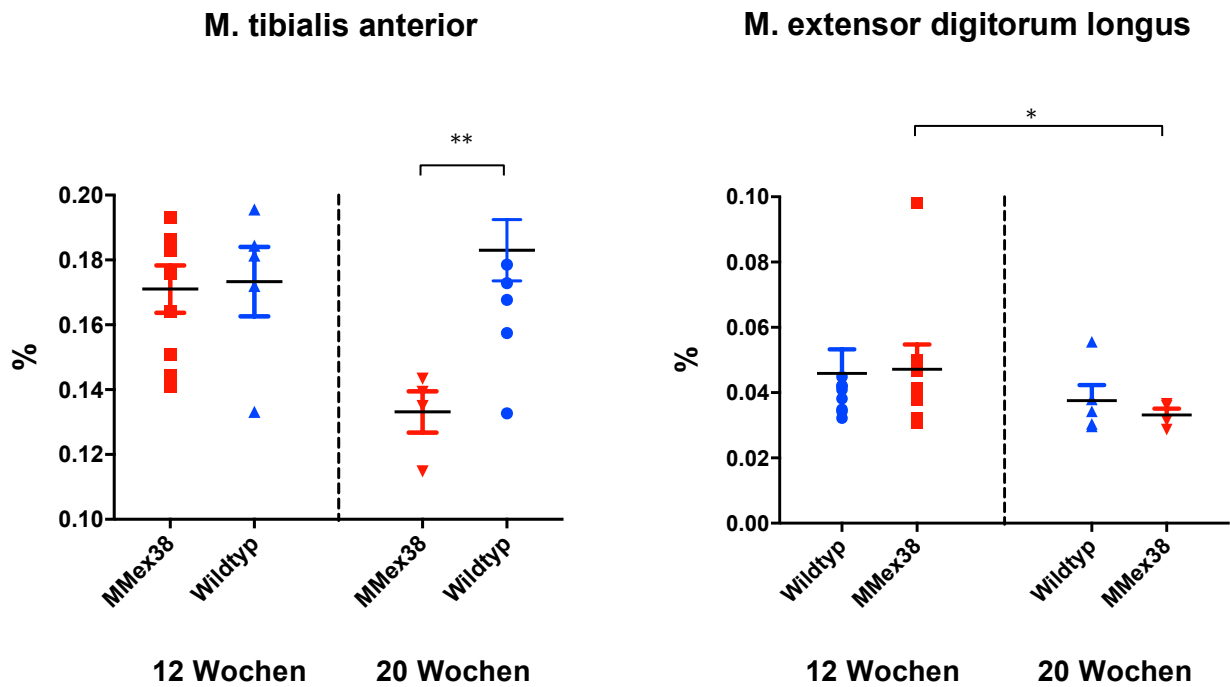


Abb. 19 – Muskelgewicht: Prozentualer Anteil des M. tibialis anterior und des M. extensor digitorum longus am Gesamtkörpergewicht bei 12 und 20 Wochen alten MMex38 und Wildtyp-Mäusen. Wildtyp 12 Wochen: N=9, MMex38 12 Wochen: N=8, Wildtyp 20 Wochen: N=5, MMex38 20 Wochen: N=4. Mittelwert und Standardfehler, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

5.7 Membranreparatur nach Laserschädigung der Muskelfaser

Untersucht wurden insgesamt je zwanzig Fasern des M. flexor digitorum longus von zwanzig Wochen alten MMex38-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen. Es wurden Übersichtsfotografien der Muskelfaser vor und nach dem Versuch angefertigt; Abb. 20 verdeutlicht die insgesamt stärkere Reaktion der MMex38-Faser auf die Laserschädigung in Form von erhöhtem Farbstoffgehalt sowie lokaler Kontraktion der Faser und Blasenbildung.

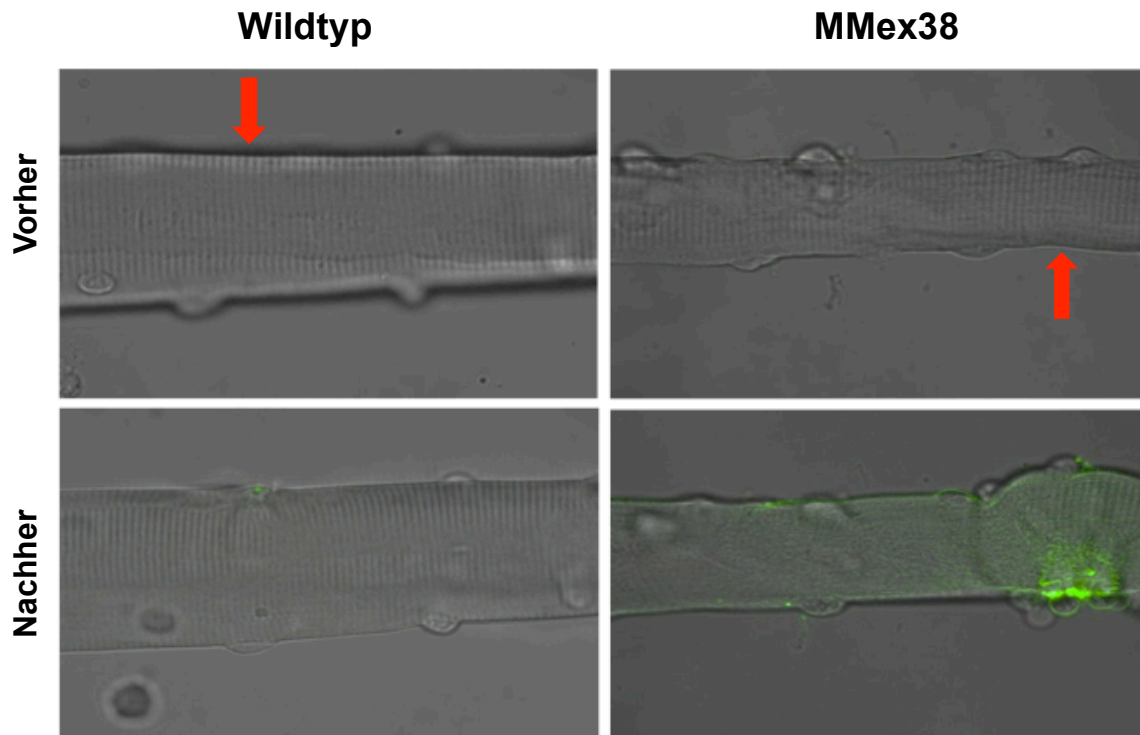


Abb. 20 – Übersichtsaufnahme Laserschädigung: Fasern von einer Wildtyp-Kontrolle und einer MMex38-Maus vor und nach der Beschädigung der Muskelmembran mit einem Laser. Die Pfeile markieren den Ort der Bestrahlung.

Abb. 21 zeigt beispielhaft Nahaufnahmen der Muskelfaser nach Laserstrahlung. Es wurden Aufnahmen im Abschnitt von jeweils 60 Sekunden angefertigt. Hierbei konnte bereits ein erhöhter Einstrom des Farbstoffes in die MMex38-Faser dargestellt werden. Dies konnte durch Messung der Farbintensität objektiviert werden (siehe Abb. 22). Die eingeströmte Menge fluoreszierenden Farbstoffes nach Laserschädigung war in den Muskelfasern der MMex38-Gruppe signifikant höher als in der Wildtyp-Gruppe ($p < 0,0001$). Die Beeinträchtigung der Membranreparatur zeigte sich durch einen zunehmenden Farbstoffeinstrom in die Zelle. Für die Negativkontrolle wurde der Versuch ohne den Zusatz von Kalzium an Muskelfasern von Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass die Reparatur der Fasermembran durch das Fehlen von Kalzium auch in den eigentlich gesunden Fasern gestört wird ($p < 0,005$).

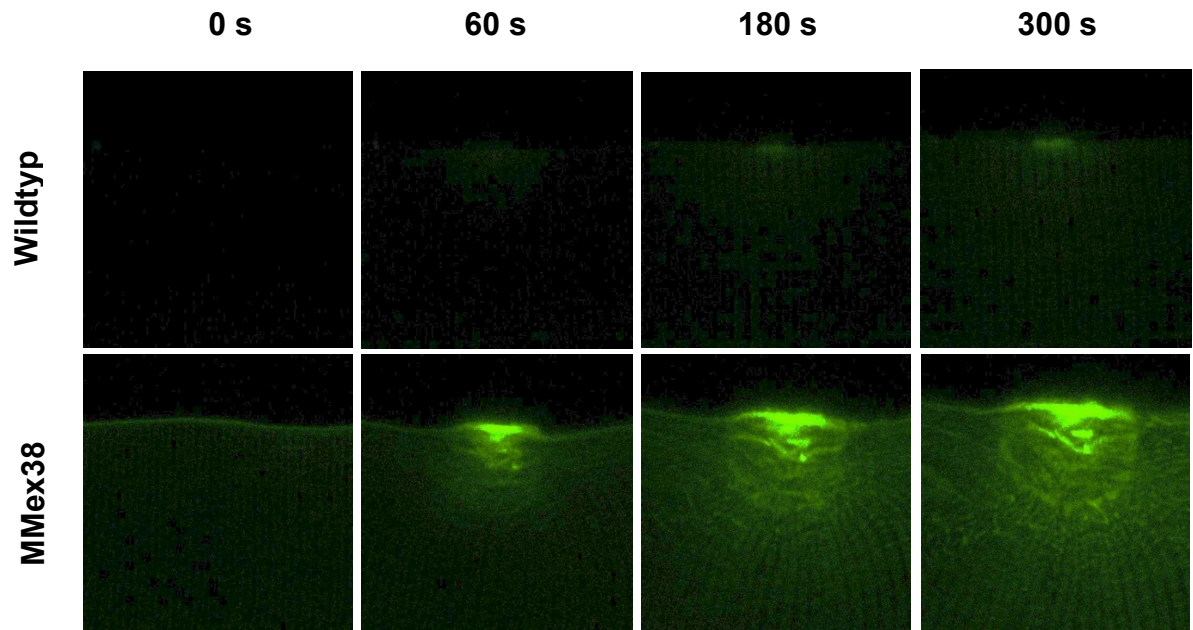


Abb. 21 - Nahaufnahme der Muskelfasern: Einstrom von fluoreszierendem Farbstoff nach 0, 60, 180 und 300 Sekunden nach Laserschädigung.

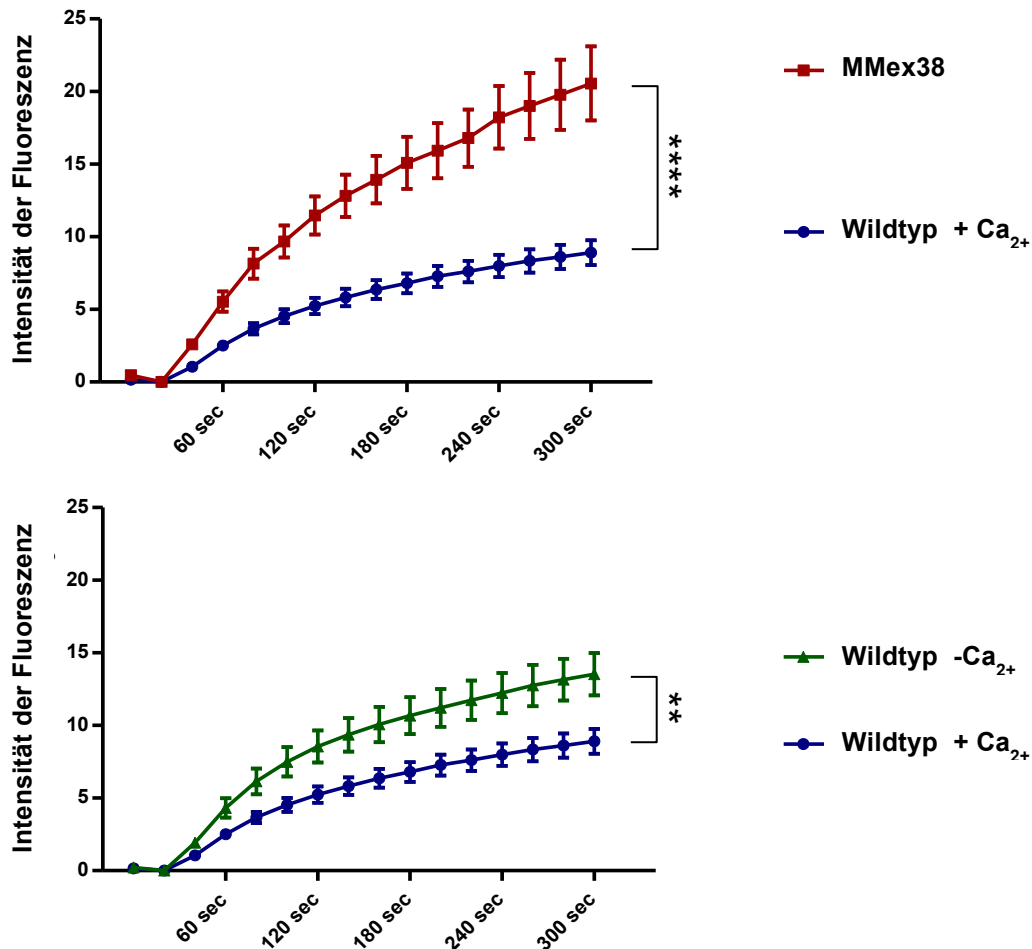


Abb. 22 – Laserschädigung: Grafische Darstellung der fluoreszierenden Intensität im Zellinneren nach Schädigung der Fasermembran mittels Laser. Oben: Vergleich zwischen MMex38-Fasern (rot), N=20 Fasern aus 3 Mäusen und Wildtyp-Fasern (blau), N=24 Fasern aus 4 Mäusen. Unten: Vergleich zwischen Wildtyp-Fasern bei Anwesenheit von Kalzium (blau) und Abwesenheit von Kalzium (grün), N=24 Fasern aus 4 Mäusen. Mittelwert und Standardfehler, ** = $p < 0,005$, **** = $p < 0,0001$.

5.8 Ketogene Diät

Es wurden sechs C57BL/6-Mäuse der Firma *Charles River (Massachusetts, USA)* als Wildtyp-Kontrollen gegen fünf MMex38-Mäuse untersucht. Ausschließlich männliche Tiere wurden in den Versuch mit ketogener Diät miteinbezogen, da auch hier der Ausdauerstest auf dem Laufband durchgeführt wurde. Im Allgemeinen haben die Versuchstiere die ketogene Diät gut vertragen. Die Tiere zeigten keine Krankheitssymptome. Es kam lediglich zu einer leichten Entfärbung des Stuhls, welche durch die Ernährungsumstellung ausreichend zu erklären war.

5.8.1 Ausdauer test mit dem Laufband

Die ketogen ernährten MMex38-Mäuse und Wildtyp-Kontrollen absolvierten ab einem Alter von 17 Wochen den Ausdauer test mit dem Laufband. Bei Abschluss des Versuches waren die Tiere zwanzig Wochen alt.

Der Vergleich dieser beider Gruppen ergab eine annähernd gleiche Ausdauerleistung in der dritten Laufbandwoche (Tag 7-9). Die durchschnittliche Laufdistanz für alle Belastungstage der dritten Woche betrug bei den MMex38-Mäusen 237 m, in der Wildtyp-Kontrollgruppe waren es 215,5 m (siehe Tab. 10 und Tab. 11). Der Vergleich mit der Ausdauerleistung unter Standardernährung zeigte eine Steigerung der Laufdistanz der MMex38-Gruppe in der dritten Woche von zuvor im Mittelwert 148,9 m auf 237 m ($p < 0,005$) unter ketogener Diät. Bei der MMex38-Gruppe konnte demnach von einer funktionellen Verbesserung durch die Nahrungsumstellung ausgegangen werden. In der Wildtyp-Gruppe kam es hingegen durch die ketogene Diät zu einer Abnahme des Leistungsvermögens in Woche 3 von zuvor 335,5 m auf 215,5 m ($p < 0,005$). (siehe Tab. 12 und Abb. 23).

Tab. 10 - Lau fdistanzen: Rohdaten der zurückgelegten Lau fdistanz der 20 Wochen alten ketogen ernährten Wildtyp-Versuchsgruppe für jeden Tag mit Belastungseinheit, sowie der Mittelwert der Lau fdistanz aller Tiere für Laufbandwoche 1 (Tag 1-3) und Laufbandwoche 3 (Tag 7-9). Angabe in Metern.

	Wildtyp KD 1	Wildtyp KD 2	Wildtyp KD 3	Wildtyp KD 4	Wildtyp KD 5	Wildtyp KD 6	
Tag 1	207	407	329,5	463	495	495	
Tag 2	189	195	294,5	284	495	399	
Tag 3	495	243	204	296,25	277	495	
Tag 4	495	287,5	228	340	308,5	291	
Tag 5	495	204	216	172,5	495	354	
Tag 6	180	900	234	189	495	277	
Tag 7	431	227,4	133,5	119,25	333	322,5	
Tag 8	79	140	288	122,5	231	211,5	
Tag 9	329,5	162,5	117,5	210	219	201	
							Mittelwert Tag 1-3 alle Wildtyp KD
Mittelwert Tag 1-3	297	281,7	276	347,75	422,3	463	348
							Mittelwert Tag 7-9 alle Wildtyp KD
Mittelwert Tag 7-9	279,8	176,6	179,7	150,6	261	245	215,5

Tab. 11 - Laufdistanzen: Rohdaten der zurückgelegten Laufdistanz der 20 Wochen alten ketogen ernährten MMex38-Versuchsgruppe für jeden Tag mit Belastungseinheit, sowie der Mittelwert der Laufdistanz aller Tiere für Laufbandwoche 1 (Tag 1-3) und Laufbandwoche 3 (Tag 7-9). Angabe in Metern.

	MMex38 KD 1	MMex38 KD 2	MMex38 KD 3	MMex38 KD 4	MMex38 KD 5	
Tag 1	207	407	329,5	463	495	
Tag 2	189	195	294,5	284	495	
Tag 3	495	243	204	296,25	277	
Tag 4	495	287,5	228	340	308,5	
Tag 5	495	204	216	172,5	495	
Tag 6	180	900	234	189	495	
Tag 7	431	227,4	133,5	119,25	333	
Tag 8	79	140	288	122,5	231	
Tag 9	329,5	162,5	117,5	210	219	
						Mittelwert Tag 1-3 alle MMex38 KD
Mittelwert Tag 1-3	471	250,5	429,7	445,7	368,3	393
						Mittelwert Tag 7-9 alle MMex38 KD
Mittelwert Tag 7-9	273,6	114,7	385,8	251,9	159	237

Tab. 12 – Laufdistanz ketogen nach Laufbandwoche: Mittelwert der zurückgelegten Laufdistanz in der ersten (Tag 1-3), zweiten (Tag 4-6) und dritten (Tag 7-9) Laufbandwoche, KD= ketogene Diät, SD= Standarddiät.

	Wildtyp SD (N=8)	Wildtyp KD (N=6)	MMex38 SD (N=6)	MMex38 KD (N=5)
Woche 1	462,6 m	348 m	389,8 m	393 m
Woche 2	360,3 m	342,3 m	209,8 m	275,3 m
Woche 3	335,5 m	215,5 m	148,9 m	237 m

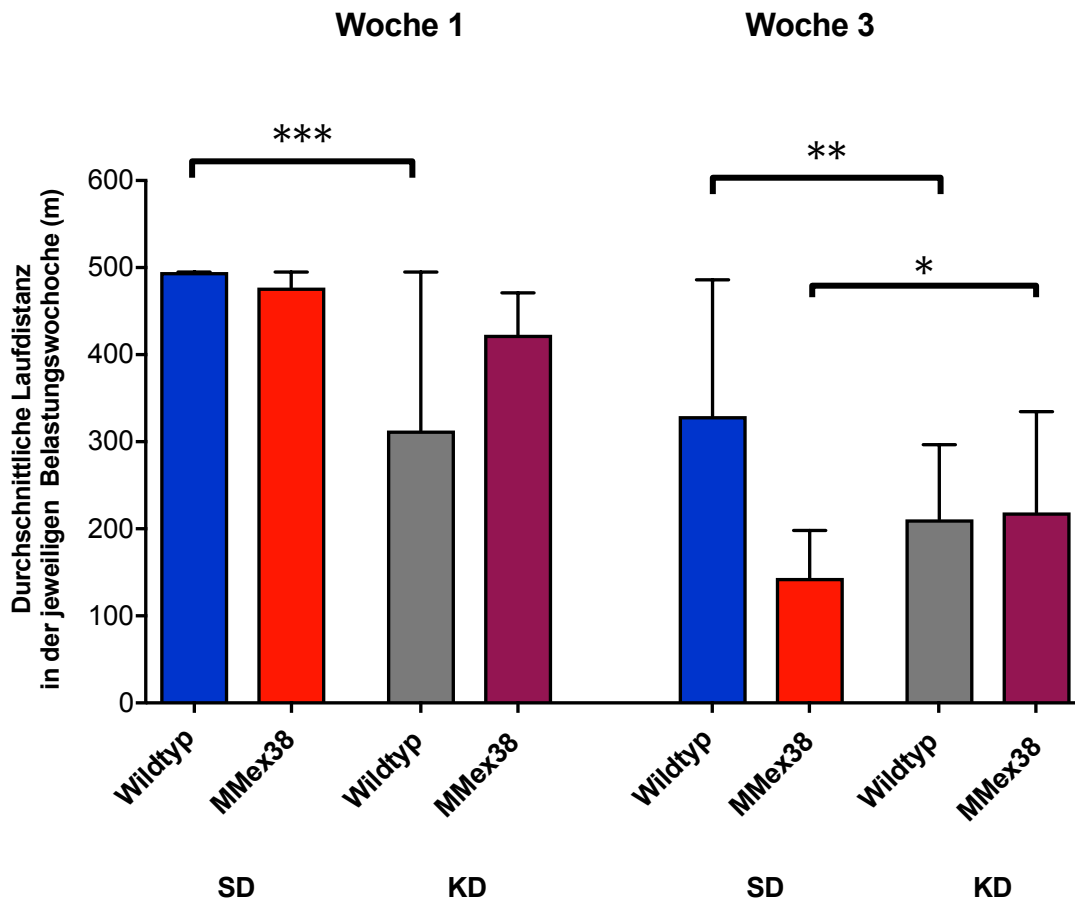


Abb. 23 - Laufdistanzen Ketogen: Die durchschnittliche Laufdistanz der ersten und dritten Belastungswoche bei 20 Wochen alten MMex38-Mäusen (rot= Standarddiät= SD, N=6 dunkelrot= ketogene Diät= KD, N=5) im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (blau= Standarddiät= SD, N=8, grau= ketogene Diät= KD, N=6), Median \pm Quartilabstand, * = $p < 0,5$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

5.8.2 Histologie

Histologisch zeigten sich nach ketogener Ernährung weiterhin Zeichen der Muskeldystrophie in Form von Atrophie, regenerierenden Fasern, zentralisierten Nuklei und nekrotischen Umbauvorgängen mit reaktiver Entzündungsreaktion (siehe Abb. 24). Nach ketogener Diät konnte im M. quadriceps eine Zunahme der nekrotischen Fasern nachgewiesen werden ($p < 0,05$). Im M. tibialis anterior kam es hingegen zu einer Abnahme der Anzahl an Fasern mit zentralisiertem Zellkern ($p < 0,005$, siehe Abb. 25).

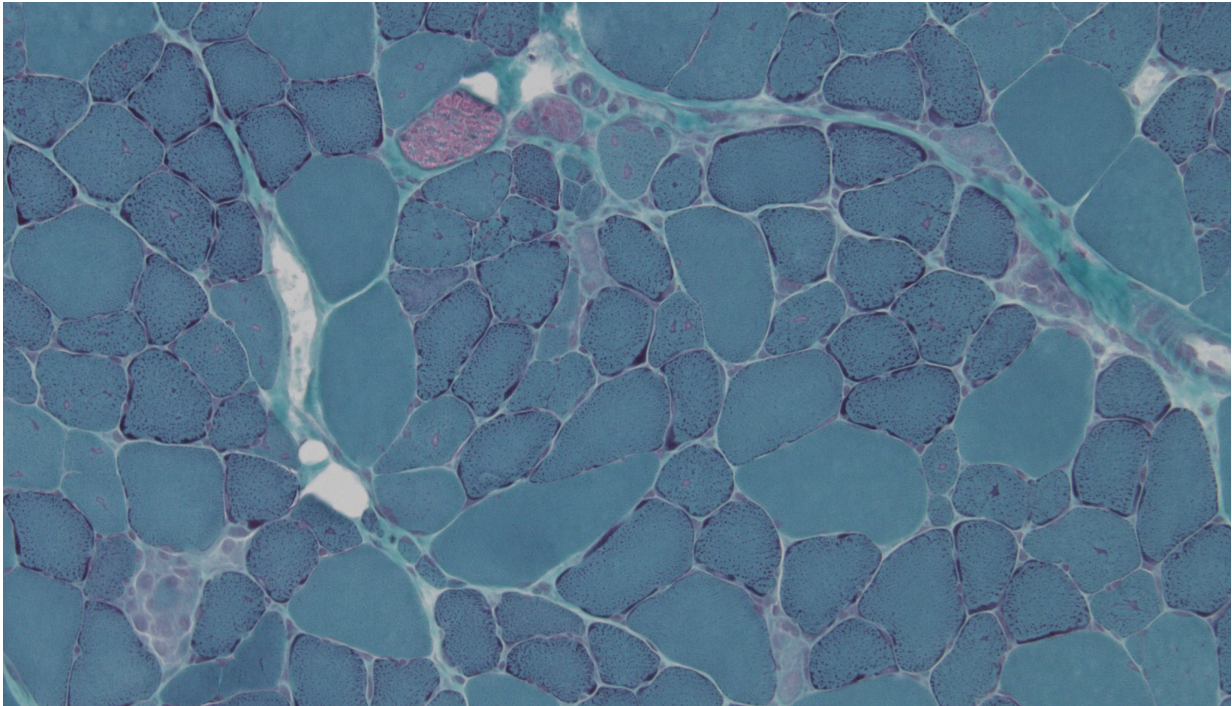


Abb. 24 – Trichrom Färbung (ketogen): M. quadriceps einer 20 Wochen alten, ketogen ernährten MMex38-Maus.

M. quadriceps

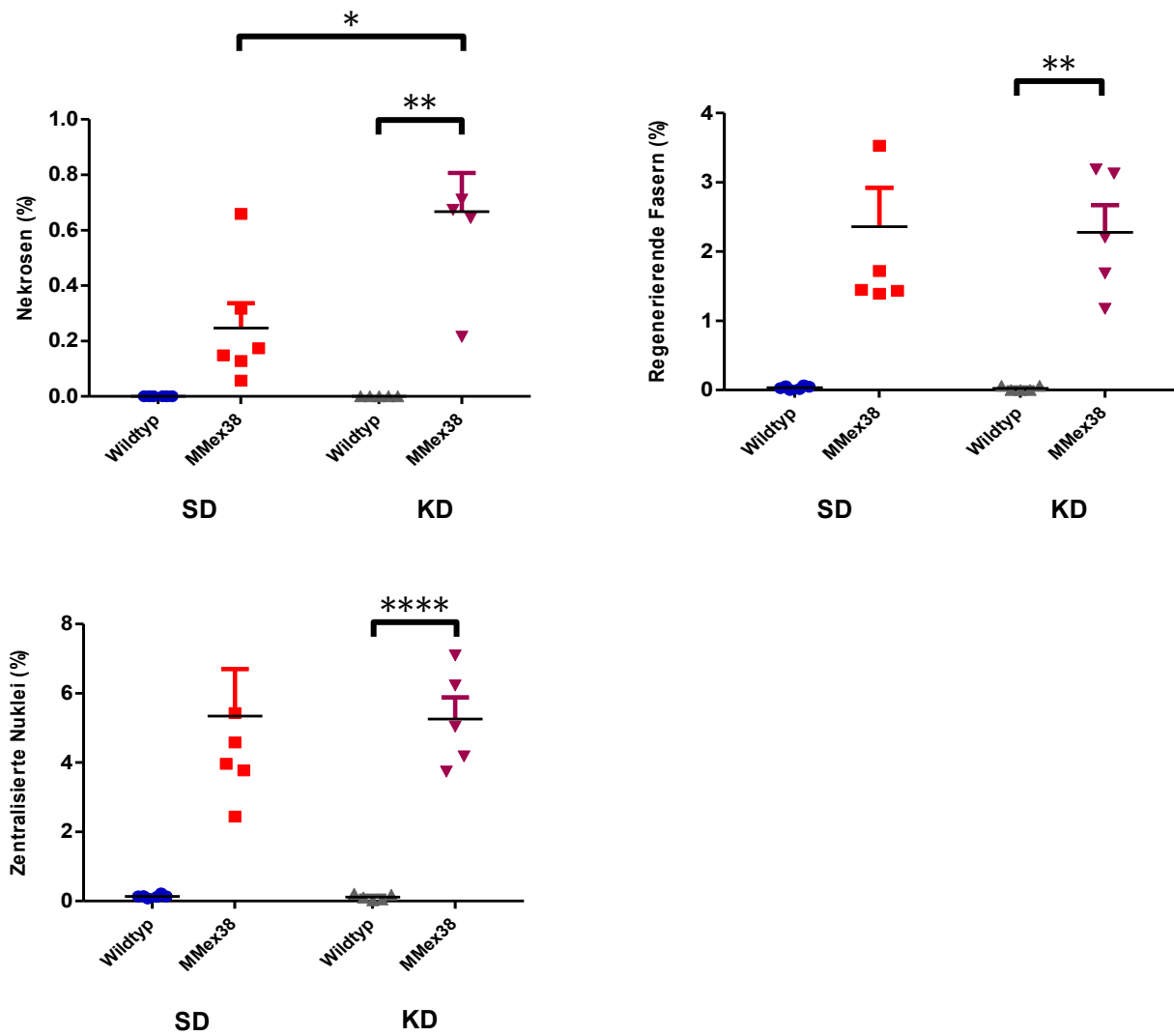


Abb. 25 – Histologie M. quadriceps (ketogen): Anzahl der Nekrosen, regenerierenden Fasern und Fasern mit zentralisierten Nuklei im M. quadriceps in 20 Wochen alten MMex38-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen die ketogen ernährt wurden (KD= ketogene Diät) im Vergleich mit den Versuchstieren, die Standardnahrung erhalten haben (SD= Standarddiät). Wildtyp SD: N= 6, Wildtyp KD: N=5, MMex38 SD: N=6, MMex38 KD: N=5. Mittelwert und Standardfehler, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,0001$.

M. tibialis anterior

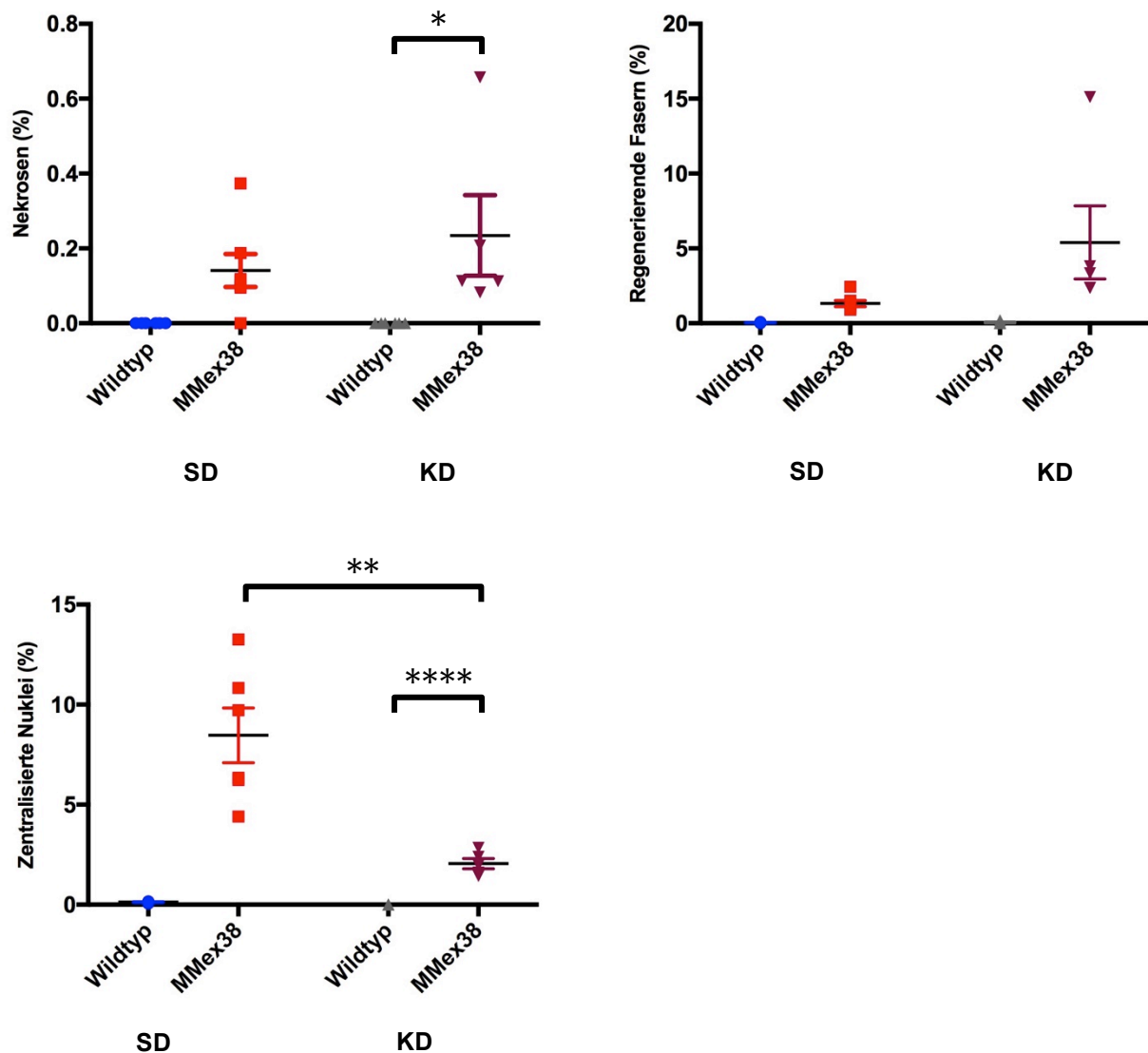


Abb. 26 – Histologie M. tibialis anterior (ketogen): Anzahl der Nekrosen, regenerierenden Fasern und Fasern mit zentralisierten Nuklei im M. tibialis anterior in 20 Wochen alten MMex38-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen die ketogen ernährt wurden (KD= ketogene Diät) im Vergleich mit den Versuchstieren, die Standardnahrung erhalten haben (SD= Standarddiät). Wildtyp SD: N= 6, Wildtyp KD: N=6, MMex38 SD: N=6, MMex38 KD: N=5. Mittelwert und Standardfehler, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,0001$.

Durch ketogene Ernährung konnte im M. quadriceps bei MMex38-Tieren eine leichte Linksverschiebung des Faserdurchmessers histologisch nachgewiesen werden (siehe Abb. 27 und Abb. 28).

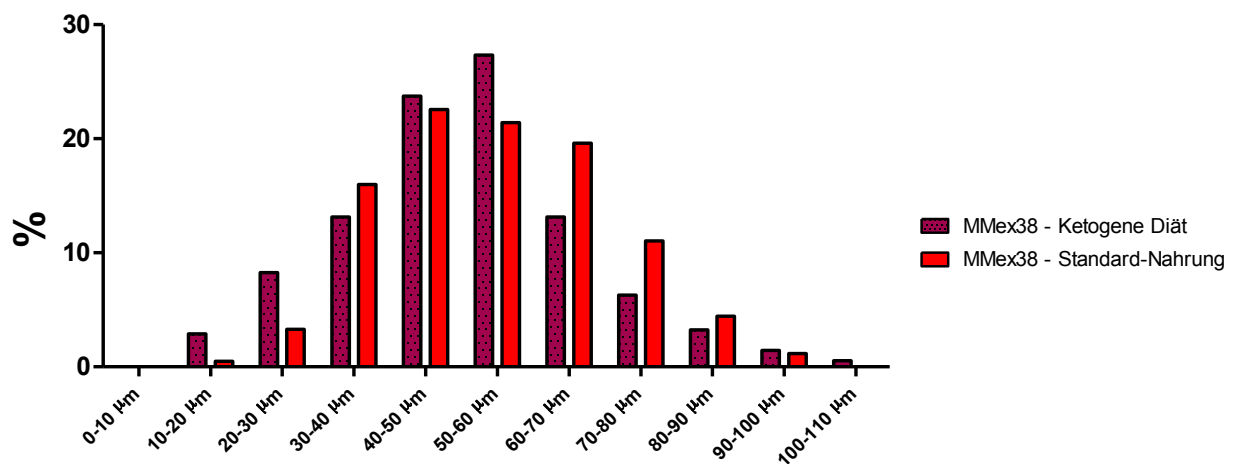


Abb. 27 – Verteilung des Faserdurchmessers (ketogen): Prozentuale Verteilung des Faserdurchmessers im M. quadriceps in 20 Wochen alten MMex38, die ketogen ernährt wurden (dunkelrot) und MMex38-Kontrollen, die Standardfutter erhalten haben (hellrot), N= >500 Fasern pro Gruppe, N= 4 Mäuse pro Gruppe.

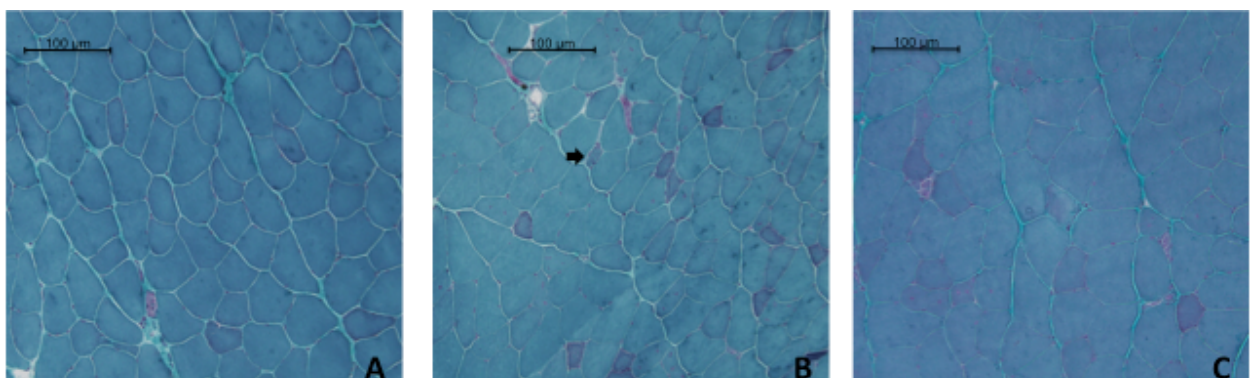


Abb. 28 – Trichrom Färbung– Atrophie (ketogen): M. quadriceps 20 Wochen alter Tiere. A: Wildtyp, ketogene Diät, B: MMex38, ketogene Diät, C: MMex38, Standarddiät, Pfeil: atrophe Muskelfaser.

5.8.3 Messung der Körperzusammensetzung

In beiden Versuchsgruppen kam es nach ketogener Ernährung zu einer leichten Abnahme des Körpergewichts. Wie auch unter Standardfutter war das Körpergewicht der MMex38-Gruppe im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe leicht erhöht. Ein Versuchstier wies ein sehr geringes Körpergewicht auf (23,5 g), sodass keine Signifikanz erreicht wurde. Auch bezüglich der fettfreien Masse, der freien Flüssigkeit und des Fettanteils zeigten sich große Variationen innerhalb der Gruppen und keine signifikanten

Unterschiede. Im Vergleich zu MMex38-Tieren, die Standardnahrung erhalten haben, kam es erwartungsgemäß zu einem Anstieg des prozentualen Fettanteils ($p < 0,005$) während der Anteil der fettfreien Masse abnahm ($p < 0,005$).

Tab. 13 – Körperzusammensetzung (ketogen): Rohdaten sowie Mittelwert von 20 Wollten alten ketogen ernährten Wildtypen (grau) und MMex38 (dunkelrot).

		Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6	Mittelwert
Körpergewicht (g)	Wildtyp	27,74	26,10	26,46	27,60	25,73	26,60	26,71
	MMex38	30,40	23,50	29,00	30,00	29,00		28,38
Freie Flüssigkeit (%)	Wildtyp	5,50	5,97	6,16	6,26	6,10	6,34	6,05
	MMex38	6,54	6,11	6,27	6,49	6,57		6,40
Fettanteil (%)	Wildtyp	20,57	24,12	21,49	25,62	18,52	26,16	22,75
	MMex38	22,66	26,32	25,75	22,97	22,40		24,02
Fettfreie Masse (%)	Wildtyp	71,72	67,63	69,91	65,46	73,17	64,92	68,80
	MMex38	68,49	65,04	65,73	68,01	68,54		67,16

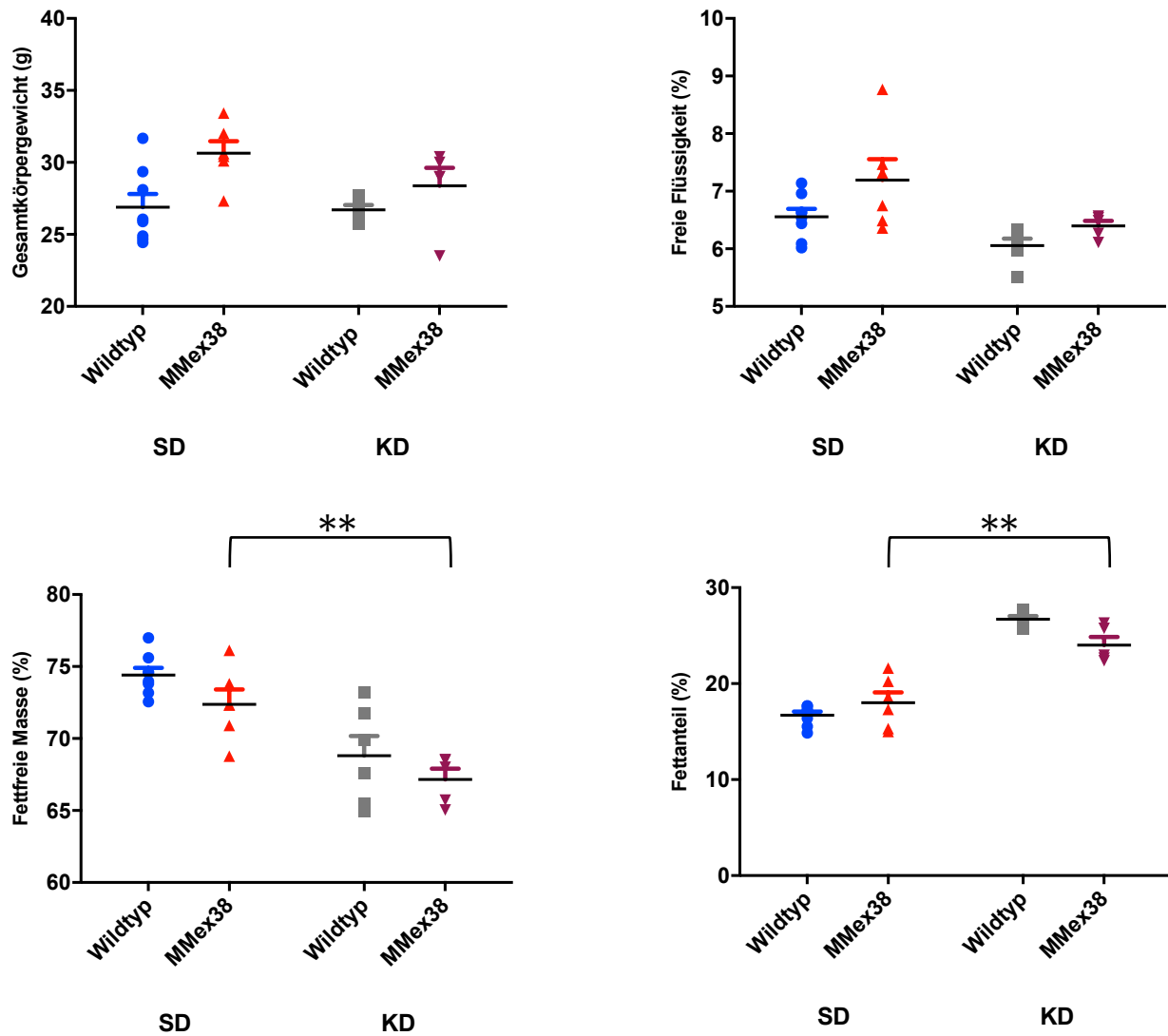


Abb. 29 - Körperzusammensetzung (ketogen): 20 Wochen alte MMex38- und Wildtyp-Mäuse, KD= ketogene Diät, SD= Standarddiät, Wildtyp SD: N= 8 , MMex38 SD: N= 6, Wildtyp KD: N= 6, MMex38: N= 5. Mittelwert und Standardfehler, ** = p<0,005.

Es erfolgte ebenfalls die Bestimmung der Muskelmasse des M. tibialis anterior und des M. extensor digitorum longus. Hierbei konnte eine Zunahme der anteiligen Muskelmasse des M. tibialis anterior am Gesamtkörpergewicht in ketogen ernährten MMex38-Tieren im Vergleich zu standardernährten MMex38-Tieren nachgewiesen werden (p<0,05). Die Auswertung des M. extensor digitorum longus zeigte keine signifikanten Unterschiede.

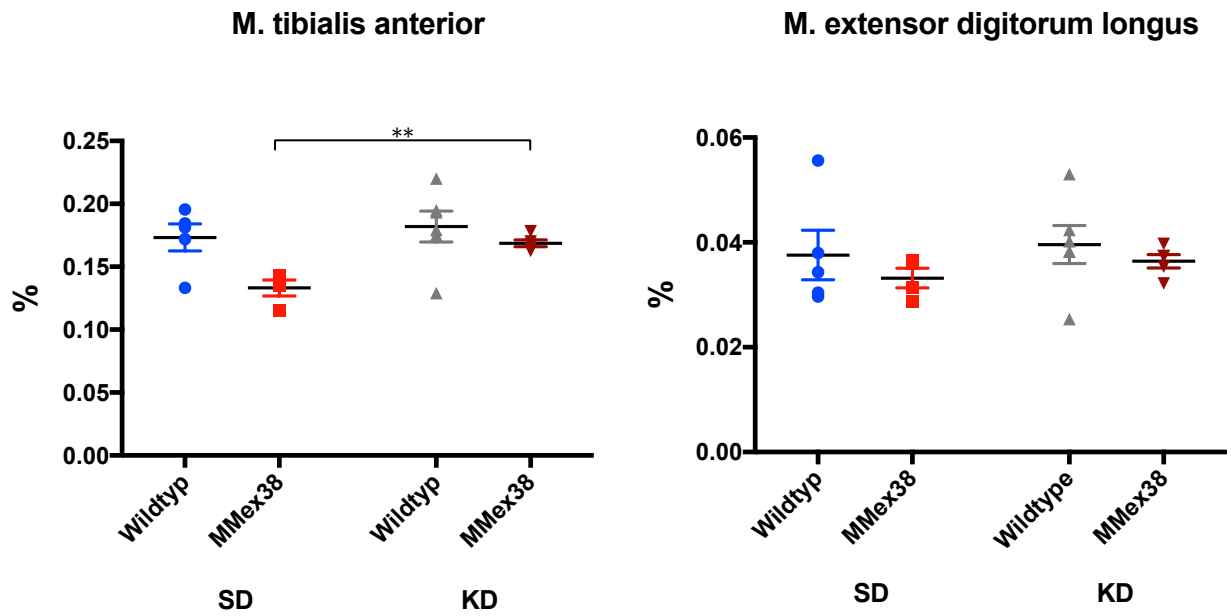


Abb. 30 – Muskelgewicht (ketogen): Prozentualer Anteil des M. tibialis anterior und des M. extensor digitorum longus am Gesamtkörpergewicht in 20 Wochen alten MMex38 und Wildtyp-Mäusen. SD= Standarddiät, KD= ketogene Diät. Wildtyp SD: N= 5, MMex38 SD: N=4, Wildtyp KD: N=6, MMex38 KD: N=5. Mittelwert und Standardfehler, ** = p< 0,01

6 Diskussion

Die Gliedergürtelmuskeldystrophie 2B ist eine dysferlindefiziente Muskeldystrophie des frühen Erwachsenenalters, welche durch über 1000 verschiedene Mutationen im Dysferlingen ausgelöst wird. Ein Drittel dieser Mutationen sind Punktmutationen. Obwohl diese nur zum Austausch einer einzelnen Aminosäure führen, zieht diese Veränderung eine Fehlfaltung des Dysferlinproteins nach sich (19). Die histologischen Veränderungen im Muskel von Patienten mit Proteinfehlfaltung unterscheiden sich von denen, bei denen die Krankheit durch ein komplettes Fehlen des Proteins ausgelöst wird. Das fehlerhafte Dysferlin wird zum einen frühzeitig abgebaut und erzeugt dann ER-Stress (71), zum anderen akkumuliert es intrazellulär und es kommt zu Amyloidablagerung (30). Bisher stand kein Mausmodell für die Dysferlinopathie zur Verfügung, bei der die Muskelpathologie durch eine Proteinfehlfaltung ausgelöst wird. Bei allen bestehenden Mausmodellen handelte es sich ausschließlich um knock-out-Modelle ohne jegliche Dysferlinexpression.

Diese Arbeit hatte zum Ziel das MMex38-Mausmodell mit Proteinfehlfaltung für die Dysferlinopathie physiologisch und histologisch zu verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufes zu charakterisieren. Die erfolgreiche Generierung des ersten Mausmodells mit Proteinfehlfaltung für die Dysferlinopathie soll ermöglichen, mutationsspezifische Therapieansätze translational *in vivo* zu testen. Die angewandten Methoden zur Charakterisierung des Mausmodells werden im ersten Teil der Diskussion erörtert. Die erhobenen Daten und daraus gefolgerten Ergebnisse werden im zweiten Teil besprochen.

6.1 Diskussion der Methoden

6.1.1 Funktionelle Tests

Ein einheitliches Protokoll für Belastungsstudien in Mäusen existiert derzeit nicht. Dies erschwert die Vergleichbarkeit verschiedener Mausmodelle mit Dysferlinopathie sowie entsprechende Effekte im Rahmen von Interventionsstudien. Forschungsverbünde wie *Treat NMD* bemühen sich deshalb um eine Vereinheitlichung von Protokollen (85). Im

Rahmen von neuromuskulären Erkrankungen fokussiert sich aber ein Großteil der Bemühungen auf die Muskelkrankheit Duchenne, der häufigsten genetisch vererbten Muskeldystrophie (86). Zur Erforschung der Dysferlinopathie und möglicher Therapieverfahren bemüht sich die private Stiftung Jain Foundation um einen besseren Zugang zu Ressourcen und um eine Diskussion um zu verwendende Protokolle (87, 88). Nicht immer wurden in der Vergangenheit in anderen Interventionsstudien mit Dysferlinopathie-Mausmodellen funktionelle Tests *in vivo* durchgeführt (89). Dann wurde sich meist auf den Membranreparaturassay (s.u.) *ex vivo* als Untersuchungsendpunkt konzentriert. Dies erscheint nicht zulässig, da die Ergebnisse dieser Untersuchung keine Rückschlüsse auf die Progression der Muskeldystrophie zulassen (35). Die in wenigen Interventionsstudien verwendeten *in vivo*-Untersuchungen variieren stark.

Auch in dieser Arbeit wurde der Ausdauererprobungsversuch mit dem Laufband für die funktionelle Charakterisierung des MMex38-Mausmodells *in vivo* verwendet. Hierbei handelte es sich um eine erzwungene Form der Belastung, bei der die Maus bis zur Erschöpfung rennen musste. Somit konnten Rückschlüsse auf die Ausdauerleistung erhoben werden. Nur männliche Tiere wurden untersucht, um geschlechterspezifische Leistungsunterschiede ausschließen zu können. Diesbezüglich zeigen Voruntersuchungen, dass weibliche Tiere verschiedener Mauslinien im Alter von 10-15 Wochen sowohl weiter als auch schneller laufen als männliche Tiere (90). Mit zunehmendem Alter bleibt die Lauflänge lange erhalten, die Laufgeschwindigkeit nimmt jedoch parallel zu den geschlechterspezifischen Unterschieden ab (91).

Zu Beginn einer Belastung erfolgt die Bereitstellung des Adenosintriphosphates (ATP) über die anaerobe Glykolyse. Die Energieausbeute kann nur für einige Sekunden gewährleistet werden. Bei länger andauernden Belastungen, muss aerob Energie bereitgestellt werden. Bis zu einer halbmaximalen Belastung kann der Energiebedarf rein aerob gedeckt werden. Da die aerobe Energiegewinnung über den Zitratzyklus und die Atmungskette erfolgt, und damit abhängig von der Anzahl der Mitochondrien ist, werden hierfür vor allem die Typ-I-Muskelfasern eingesetzt (92). Der Sauerstoffverbrauch steigt im submaximalen Bereich linear zur Belastungsintensität an, bis ein Plateau erreicht ist ($V_{O_{2max}}$) (93). Bei höheren Belastungen, wenn $V_{O_{2max}}$ bereits erreicht ist, erfolgt die Energiegewinnung teilweise wieder anaerob durch die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat in den schnellen Typ-II-Fasern. Diese ermüden bei maximaler Belastung bereits nach einigen Sekunden. Ayachi et al. konnten zeigen,

dass die höchste V_{O2max} erreicht wird, wenn die Geschwindigkeit kontinuierlich entsprechend 3 m/min (= 5 cm/s) alle zwei Minuten gesteigert wird und eine Steigung von 0° besteht. Da die Belastung erst bei Erschöpfung abgebrochen wurde, konnten maximale Laufgeschwindigkeiten von ungefähr 75 cm/s erreicht werden (94). Laut Høydal et al. lässt sich jedoch ohne Kenntnis über die individuelle maximale Sauerstoffaufnahme kein einheitlicher Bezug zwischen der Laufgeschwindigkeit und der Trainingsintensität herstellen (95). Eine Geschwindigkeit, bei der es im Allgemeinen zur Erschöpfung kommt, lässt sich daher vor Durchführung der Versuche nicht festlegen.

Bei dem in dieser Studie gewählten Protokoll lag die Startgeschwindigkeit bei 15 cm/s. Dies entspricht einem langsamen Fortbewegungstempo der Mäuse im Käfig. Hierdurch wurde die Muskulatur vor dem Beginn der eigentlichen Belastung aufgewärmt. Darüber hinaus wurden die Versuchstiere an das Laufen auf dem Laufband gewöhnt. Die Belastungsdauer von 30 Minuten sollte gewährleisten, dass die aerobe Glykolyse sowie die Lipolyse zur Aufrechterhaltung des ATP-Spiegels eingesetzt wurden. Durch die Kombination von Langzeitbelastung und maximaler Belastung (ab ca. einer Geschwindigkeit von 30 cm/s) sollte durch das durchgeführte Protokoll eine Beanspruchung sowohl der Typ-I-Fasern als auch der Typ-II-Fasern erreicht werden.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass eine Steigung des Laufbandes um 15-35° zu einer höheren V_{O2max} beitragen kann (96). Dies beruht auf einem höheren Anteil der konzentrischen Muskelarbeit am Bewegungsablauf und damit einem größeren Energieaufwand bei steilerer Strecke (97, 98). Bei der Dysferlinopathie hat sich gezeigt, dass besonders exzentrische Muskelarbeit negative Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf hat (99). Daher wurde für die Belastung auf dem Laufband mit den MMex38-Mäusen eine Abwärtsneigung von 5° gewählt um den Anteil der exzentrischen Muskelarbeit zu erhöhen und pathologische Veränderungen gegebenenfalls zu provozieren.

Die unterschiedlichen Versuchsgruppen konnten in der ersten Laufbandwoche die geforderte Intensität der Belastung durchweg erbringen. Nur vereinzelt mussten die Tiere das Protokoll vorzeitig beenden. Ab der zweiten Woche jedoch hat die Ausdauerleistung in allen Gruppen kontinuierlich abgenommen. Da auch die Wildtyp-Mäuse diese Tendenz zeigten, ist nicht davon auszugehen, dass es in kurzer Zeit belastungsinduziert zu einer Verschlechterung der Muskeldystrophie in den dysferlindefizienten Mäusen gekommen ist. Tatsächlich zeigte sich histologisch keinerlei vermehrte muskeldystrophische Zeichen durch die starke Belastung im

Vergleich zu unbelasteten Tieren (siehe Tab. 8) Es kann davon ausgegangen werden, dass es durch die Stringenz des Protokolls zu einer Überlastung in allen Tieren, unabhängig vom Genotyp, kam. Demnach handelte es sich bei dem gewählten Protokoll nicht um ein Ausdauertraining mit Zunahme der Leistungsfähigkeit, sondern um eine supramaximale Belastung mit kontinuierlicher Erschöpfung. Um dies näher zu analysieren, hätte während des Ausdauertests mit dem Laufband der Laktatgehalt im Blut über einen Blutropfen aus der Schwanzvene mittels Laktatmessgerät bestimmt werden können (100). Bei Untersuchungen am lebendigen Tier hätte es sich um einen weiteren genehmigungspflichtigen Tierversuch gehandelt. Derartige Messungen sind nicht erfolgt. Ebenso ist es möglich durch Aufbereitung von Muskelgewebe post mortem den Muskellaktat- und Glykogengehalt zu ermitteln (101).

Ziel dieser Untersuchung war, mögliche physiologische Leistungsunterschiede zwischen Wildtyp- und MMex38-Mäusen unterschiedlichen Alters und somit unterschiedlicher Krankheitsstadien zu evaluieren. Wie schon mehrfach in Knockout-Modellen gezeigt wurde, verläuft die Dysferlinopathie im Mausmodell relativ milde. Aus diesem Grund wurde ein besonders leistungsintensives Protokoll verwandt. Die Unterschiede zwischen MMex38- und Wildtyp-Tieren konnten so gut erfasst und die Krankheitsprogression im MMex38 Mausmodell valide herausgearbeitet werden. Dies ermöglicht Interventionsstudien, wie wir durch die Ernährungsumstellung gezeigt haben.

Um weitere Daten zum Aktivitätsprofil der Mäuse zu erhalten, wurde den Mäusen ein Laufrad in den Käfig gestellt. Dieses misst über eine Software die Anzahl der Umdrehungen des Laufrads über einen bestimmten Zeitraum. Es dient daher der Evaluation der freiwilligen Aktivität im Vergleich zur erzwungenen Belastung auf dem Laufband. Trotz mehrtägiger Gewöhnung an das Laufrad ignorierten einige Tiere – unabhängig von Alter und Krankheitsstatus – das Laufrad gänzlich. Nur wenige Mäuse, sowohl aus der MMex38-Gruppe, als auch aus der Wildtyp-Gruppe, nutzten das Laufband überhaupt und dann auch in sehr unterschiedlichem Ausmaß. Dies galt sowohl für den Vergleich zwischen Tieren einer Kohorte als auch für die Nutzung eines einzelnen Tieres an verschiedenen aufeinanderfolgenden Versuchstagen. Die erhobenen Daten wurden in der vorliegenden Arbeit nicht beschrieben. Um aussagekräftige Ergebnisse generieren zu können, wäre für die Untersuchung eine weitaus höhere Anzahl an Versuchstieren unabdingbar. Um die Krankheitsprogression

und den Effekt einer Intervention zu untersuchen, sollte insbesondere unter dem ethischen Aspekt der Geringhaltung von Versuchstieren (102) das Laufband gegenüber dem Laufrad bevorzugt werden.

Zur klinischen Einschätzung des Krankheitsverlaufs wurde des Weiteren das Gesamtkörpergewicht und die Körperzusammensetzung betrachtet. Dies kann Hinweise bezüglich der körperlichen Aktivität, oder Rückschlüsse über einen bindegewebigen oder fettgewebigen Umbau der Muskulatur liefern.

Die hierfür angewandte Untersuchung basiert auf quantitativer, nuklearer Magnetresonanzmethode und analysiert Signale aller Protone des gesamten Versuchsobjektes. Dabei erhält man nichtinvasiv exakte Werte bezüglich des Gesamtkörpergewichts und des Anteils der Fettmasse, der fettfreien Masse und der freien Flüssigkeit. Da kein Anästhetikum verwendet wurde und die Messung weniger als zwei Minuten dauerte, wurde das Versuchstier nur minimalem Stress ausgesetzt, wobei keine gesundheitlichen Risiken entstanden. Taicher et al. konnten durch die Untersuchung mehrerer Mauslinien, die entweder auf Grund der Ernährung oder einer Erkrankung Unterschiede bezüglich ihrer Körperzusammensetzung zeigten, die Vorteile der quantitativen Magnetresonanzuntersuchung darlegen; Trotz geringer Abweichungen bei der Untersuchung am lebendigen, sich bewegenden Tier, zeigte sich eine geringere Varianz der Messungen als durch die Analyse mittels Röntgen-Absorptionsmessung (103). Übereinstimmend belegten Jones et al. die Genauigkeit der Magnetresonanzmethode anhand ihrer Übereinstimmung mit chemischen Analysen, die an toten Mäusen durchgeführt wurden (104).

Der Membranreparaturassay an einzelnen isolierten Muskelfasern ist der bisher weltweit anerkannteste Test, um die Funktionsfähigkeit des Dysferlin zu testen und wurde deshalb auch bei der Charakterisierung des MMex38-Mausmodells durchgeführt. Er wurde erstmals von Bansal et al. an Fasern des Tiermodells *Dysf*^{-/-} etabliert und 2003 publiziert (16). McDade et al. wendeten das Verfahren 2014 in den dysferlindefizienten A/J-Mäusen sowie in einer speziell gezüchteten Maus an, deren Dysferlinprotein pH-abhängig fluoresziert, um die Lokalisation des Dysferlins während des Membranreparaturprozesses nachzuvollziehen (26). Dadurch konnte gezeigt werden, dass bei einer Beschädigung der Muskelmembran sarkolemmales Dysferlin an den Ort der Schädigung rekrutiert wird. Hierdurch entsteht eine Zone mit hoher

lipidbindender Aktivität (26). Diese fördert die Interaktion mit Reparaturvesikeln und begünstigt die Heilung des Skelettmuskels. Lostal et al. konnten 2010 durch die Applikation von AAV-gebundenem „Minidysferlin“ eine verbesserte Membranreparatur *in vitro* mit diesem Verfahren nachweisen (55). *In vivo* kam es jedoch zu keiner Verbesserung der Muskelhistologie (35). Dies lässt auf weitere, für die Muskelzelle essentielle Dysferlinfunktionen schließen.

6.1.2 Histologische Tests

Für die histopathologische Untersuchung wurden klassische Zeichen der Muskeldystrophie wie die Anzahl regenerierender Fasern, nekrotischer Fasern, sowie Fasern mit zentralisierten Nuklei betrachtet. Darüber hinaus wurde der Faserdurchmesser als Parameter für Muskelatrophie, sowie das Vorhandensein von entzündlichen Veränderungen, bindegewebiger und fettgewebiger Umbau, intrazelluläre Lipidakkumulation und Amyloid-Ablagerungen bestimmt. Die Trichrom-Färbung und Öl-Rot-Färbung sind etablierte Protokolle in der diagnostischen Myologie zum Nachweis solcher pathologischer Veränderungen (79, 81). Diese Färbungen eignen sich daher zur objektiven Beurteilung histologischer Parameter auf Grund ihrer hohen und wissenschaftlich erprobten Aussagekraft.

Amyloidosen sind eine Gruppe von hereditären oder erworbenen Erkrankungen, die durch eine Fehlfunktion im Proteinmetabolismus ausgelöst werden. Die normalerweise löslichen Proteine oder Polypeptide lagern sich zu fibrillären Strukturen im extrazellulären Kompartiment ab und akkumulieren (84). In polarisierendem oder fluoreszierendem Licht können Amyloidablagerungen durch die Kongorot-Färbung detektiert werden (80). Dieser Untersuchung war wichtig um spezifische Zeichen einer Proteinfehlfaltungserkrankung nachzuweisen und die Analogie zur humanen Muskelpathologie herzustellen. Um die Objektivität der Untersuchung zu erhöhen, wurde die Auswertung verblindet durchgeführt.

In der murinen Muskulatur besteht eine andere Muskelfaserverteilung als in der menschlichen Skelettmuskulatur. Beim Menschen sieht man in der ATPase-Färbung der Extremitätenmuskulatur eine schachbrettförmige Verteilung von Typ-I-Fasern und Typ-IIb-Fasern sowie einige wenige Typ-IIa-Fasern. In der Maus ist der vorherrschende

Muskelfasertyp jedoch die Typ-IIb-Muskelfaser. Lediglich im M. soleus finden sich einige langsame Typ-I-Muskelfasern (105). Dieser Muskel besteht in der Maus aus nur einigen hundert Muskelfasern. Er gehört bei der LGMD2 nicht zu den primär betroffenen Muskeln.

Bei Patienten mit Dysferlinopathie lässt sich insbesondere eine Atrophie der Typ-II-Muskelfasern nachweisen (28). Es existieren derzeit keine Daten darüber, ob dies auch in dysferlindefizienten Mäusen der Fall ist. Im MMex38-Mausmodell konnte auf Grund der geringen Fasermenge des M. soleus keine Aussage bezüglich einer faserspezifischen Atrophie der Typ-IIb-Muskelfasern beziehungsweise einer geringeren Atrophie der Typ-I-Fasern getroffen werden. Auf Grund der geringen Größe des M. soleus der Maus und dem damit limitierten Beitrag am Gesamtmetabolismus der Muskulatur ist außerdem fraglich ob physiologische Untersuchungen insbesondere zu den Typ-I-Fasern im Mausmodell anhand von Bewertungen des M. soleus aussagekräftig genug sind, um sie mit dem menschlichen Organismus vergleichen zu können.

6.1.3 Ketogene Diät

Als Ketose bezeichnet man den Zustand, bei dem für die Energiegewinnung anstelle von Glukose Ketonkörper verwendet werden. Zunächst werden in den Adipozyten dazu Triacylglyceride zu Glyzerol und Fettsäuren gespalten. Hepatozyten können dann die Fettsäuren in Ketonkörper umwandeln, welche als Energiesubstrate dienen können. Normalerweise wird der Energiehaushalt hauptsächlich über die Glykogenolyse und Glukoneogenese reguliert (106). Eine Ketose wird im menschlichen Organismus einerseits durch Nahrungskarenz induziert und andererseits dann, wenn keine Glukose zur Energiegewinnung angeboten wird. Bei der Nahrungskarenz kann nachgewiesen werden, dass die hepatische Glukoneogenese und die daran beteiligten Enzyme hochreguliert werden (107). Es wird angenommen, dass dies auch bei ketogener Ernährung der Fall ist (107). Eine ketogene Ernährung wird als solche bezeichnet, wenn sie im Körper eine ketogene Stoffwechsellage induziert. Erreicht wird dies durch einen sehr geringen Anteil an zugeführten Kohlenhydraten. Klinisch wird die ketogene Diät bei pädiatrischen Patienten mit therapieresistenter Epilepsie und Glukosetransporter- oder Glukoseverwertungsstörung (z.B. GLUT1-Defizit-Syndrom, Pyruvatdehydrogenasemangel) therapeutisch eingesetzt (108-111). Bereits wenige

Tage nach Ernährungsumstellung wird die ketogene Diät sehr gut vertragen. Es kann dennoch zu vorübergehenden Nebenwirkungen wie Verdauungsproblemen und Veränderungen des Stuhlgangs sowie vermehrter Müdigkeit kommen. Langfristige Folgen wurden in Form von Hypercholesterinämie, und erhöhter Neigung zu Nierensteinen beobachtet (112, 113). Auch in Tierversuchen wurde die ketogene Diät bereits getestet und die gute Verträglichkeit der Nahrungsumstellung bestätigt; Es kam zu keinen gehäuften Erkrankungen der untersuchten Mäuse. Lediglich in den ersten drei Wochen wurde ein Gewichtsverlust von 14 % beobachtet, im Anschluss bleibt das Gesamtkörpergewicht stabil (83, 114).

In Ratten kann eine echte ketotische Stoffwechsellage nur erreicht werden, wenn gleichzeitig auch der Proteingehalt der Nahrung verringert ist (115). Wenn der Kohlenhydratanteil der Nahrung sehr gering ist, wird der Energiebedarf über die Verstoffwechslung von Lipiden erreicht (116-118). Bei Athleten, die ketogen ernährt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass das geringere Glukoseangebot nicht durch eine verstärkte Glukoneogenese kompensiert wurde (119). Ein wichtiger Effekt auf den Körper durch die ketogene Diät ist die bereits beschriebene Gewichtsabnahme. Der Stoffwechselumsatz wird erhöht und es kommt zur vermehrten Expression von Stoffwechselenzymen der Fettsäureoxidation (83). Die systemischen Effekte werden zudem durch die erhöhte Produktion von Ketonkörpern in der Leber ausgelöst. Diese scheint durch einen erhöhten Energieverbrauch ausgelöst zu werden (83, 120) und ist auf den Verlust von fettfreier Masse zurückzuführen bei gleichzeitig erhöhtem Fettanteil sowohl in Menschen als auch in Ratten (115, 121-123). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Diät mit hohem Fettanteil und geringen Kohlenhydratanteil in Mäusen zu einer hepatischen Insulinresistenz führt (120). Für die Ausdauerleistung konnte nachgewiesen werden, dass die maximale Fettoxidation bei einer ketogenen Ernährung gesteigert ist, insbesondere bei submaximaler Belastung und diese bei einer höheren VO_{2max} stattfindet (124). In der Literatur gibt es verschiedene Studienergebnisse zum Thema Sport und Ernährung. Die Vorteile der ketogenen Ernährung liegen für Ausdauersportler in der resultierenden Abnahme des Körpergewichts und einer Optimierung der Körperzusammensetzung. Zudem ist die Verwertung von Fetten als Energiesubstrat bei einer kohlenhydratarmen und fettreichen Ernährung gesteigert (125). Bei körperlichen Aktivitäten von niedriger bis mittlerer Intensität kann die ketogene Ernährung demnach eingesetzt werden, um diesen Zustand der optimierten Körperzusammensetzung zu erreichen, ohne Einbußen in der

Ausdauerleistung in Kauf nehmen zu müssen (126). Bei hohen Intensitäten kommt es hingegen zu einem Leistungsabfall durch die reduzierten Glykogenspeicher der Muskulatur und die verringerte Aktivität glykolytisch aktiver Enzyme (127).

Die Umstellung des Futters auf ketogene Nahrung ist im Tierversuch eine einfach durchzuführende Maßnahme. Durch die festen Bestandteile kann gewährleistet werden, dass die Lipolyse den vorwiegenden energieliefernden Stoffwechselweg darstellt. Durch den hohen Anteil an Fett (75,1 %) und geringen Proteingehalt (8,6 %) über einen Zeitraum von insgesamt acht Wochen kann sicher davon ausgegangen werden, dass in den Mäusen eine ketogene Stoffwechsellage vorgelegen hatte. Zur weiteren metabolischen Beurteilung im MMex38-Mausmodell führen wir derzeit metabolomische Studien in MMex38-Mäusen durch.

Die ketogene Diät wurde im MMex38-Mausmodell als interventioneller Ansatz eingesetzt. Bisher gibt es in der Literatur keinen Hinweis auf eine Beteiligung des Dysferlins an der Glykolyse, allerdings weisen unsere aktuellen Daten auf eine beeinträchtigte Glykolyse bei Dysferlindefizienz hin. Durch die Nahrungsumstellung sollten Hinweise auf die Relevanz der Dysferlinbeteiligung am Muskelstoffwechsel untersucht werden.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Das MMex38-Mausmodell

Das untersuchte Mausmodell enthält die zur humanen Mutation *DYSF* p.L1341P analoge murine Punktmutation *Dysf* p.L1360P in Exon 38. Hierdurch kommt es zum Aminosäureaustausch von Leucin zu Prolin, wodurch fehlgefaltetes Dysferlin gebildet wird. Die genannte humane Mutation tritt in einer großen Kohorte von Patienten, die der Muskelambulanz der Charité Campus Buch angebunden sind, auf. Dies ermöglichte den direkten Vergleich funktioneller und physiologischer Charakteristika des Mausmodells mit vorliegenden Daten zu pathologischen Veränderungen im Patienten.

6.2.2 Funktionelle Tests

6.2.2.1 Ausdauerterest mit dem Laufband

Die Ausdauerleistung auf dem Laufband entsprach bei den zwölf Wochen alten MMex38-Mäusen denen der Wildtyp-Kontrollgruppe. Erst in zwanzig Wochen alten MMex38-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen bestand eine signifikante Leistungsdifferenz. Während in der ersten Woche der Belastung auch hier gleichwertige Ausdauerleistungen erbracht wurden, nahm die Leistungsfähigkeit der MMex38-Tiere mit der kontinuierlichen Belastung in Woche zwei und drei entsprechend stärker ab als in der Wildtyp-Gruppe. Eine progrediente Beeinträchtigung der Muskelfunktion mit fortschreitendem Krankheitsverlauf bei den MMex38-Mäusen konnte demnach nachgewiesen werden, bedurfte aber dem stringenten Protokoll mit starker Belastung. Insgesamt verläuft die muskeldystrophische funktionelle Beeinträchtigung im Mausmodell im Vergleich zum Patienten demnach zwar relativ milde, spiegelt aber den progressiven Krankheitsverlauf bei Patienten wieder. Erst im jungen Erwachsenenalter kommt es auch hier zu zunehmenden Einschränkungen der Muskelfunktion (36).

6.2.2.2 Körperzusammensetzung

Eine Zunahme des Körpergewichts im Vergleich zu Kontrolltieren zeigt sich beispielsweise bei mdx-Mäusen, einem Mausmodell für die Duchenne-Muskeldystrophie (128). Diese Mäuse zeigen sowohl ein höheres Gesamtkörpergewicht wie auch eine erhöhte anteilige Muskelmasse. Dies wird darauf zurückgeführt, dass aufgrund des gesteigerten Regenerationsprozesses im Rahmen der Dystrophie eine Hypertrophie der Muskulatur induziert wird. Zum Gesamtkörpergewicht anderer dysferlindefizienter Mausmodelle gibt es nur Arbeitsgruppen-eigene Daten. Die BLA/J Mäuse (Dysferlin Knock-out auf B6 Hintergrund) waren hier in unseren Untersuchungen schwerer als entsprechende Wildtyp-Kontrolltiere gleichen Alters und Geschlechtes. Bei Patienten mit Dysferlinopathie kommt es oft erst mit fortschreitender Immobilität zu einer Gewichtszunahme und es ist demnach schwer abzugrenzen, inwieweit die eigentliche Dysferlin-Defizienz und ein möglicher Stoffwechselphänotyp dazu beiträgt. Letztlich gehören aber ohnehin regelmäßige Gewichtskontrollen und gegebenenfalls Nahrungsumstellung zum klinischen Management für Patienten mit Dysferlinopathie.

Die MMex38-Tiere im Alter von zwanzig Wochen zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren eine Zunahme des Gesamtkörpergewichtes. Es ist aufgrund der eher geringeren phänotypischen Beeinträchtigung der Tiere nicht davon auszugehen, dass sich die MMex38-Tiere bei Käfighaltung mit einem ohnehin eingeschränkten Bewegungsradius deutlich weniger bewegen als die Wildtyp-Tiere. Entsprechend dem klinischen Bild einer Muskeldystrophie war der Anteil der fettfreien Masse, also der Muskelmasse reduziert. Auch im histologischen Nachweis zeigte sich eine entsprechende Muskelatrophie in den MMex38-Mäusen (siehe Abb. 16). Der prozentuale Fettanteil war bei der Untersuchung der Körperzusammensetzung nicht signifikant erhöht. Die Gewichtssteigerung geht jedoch mit einer Zunahme der freien Flüssigkeit einher. Eine Vergrößerung der Versuchsgruppen könnte sinnvoll sein, um genauer zu ermitteln, welche Faktoren zur Gewichtszunahme beitragen.

Die Messung des Muskelgewichtes des M. extensor digitorum longus zeigte eine verringerte Muskelmasse der MMex38-Mäuse gegenüber den Wildtyp-Kontrollen. Für den M. tibialis anterior konnte kein Unterschied zwischen den Kohorten gezeigt werden, allerdings kam es zu einer Abnahme der Muskelmasse bei zwanzig Wochen alten MMex38-Mäusen im Vergleich zu zwölf Wochen alten MMex38-Mäusen.

6.2.2.3 Membranschädigung mittels Laser

Nach Membranschädigung mittels Laser konnte durch den erhöhten Einstrom fluoreszierenden Farbstoffes in die Muskelfaser bei den MMex38-Mäusen eine signifikante Beeinträchtigung der Membranreparatur (Verlangsamung des Wundverschlusses) nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht den Resultaten, die in anderen Dysferlinopathie-Mausmodellen erhoben wurden. Die Unterschiede zwischen MMex38-Mäusen und der Wildtyp-Kontrollgruppe sind hochsignifikant und eignen sich demnach gegebenenfalls für Interventionsstudien. Die Aussagekraft entsprechender Veränderungen ist allerdings limitiert, da dies keinen Rückschluss auf den Verlauf der Muskeldystrophie zulässt (35).

6.2.3 Proteinanalyse

Durch Antikörperfärbungen am histologischen Schnitt und Western Blot-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass Dysferlin exprimiert, jedoch die Menge des

Dysferlins im MMex38-Mausmodell essentiell reduziert und nicht an der Muskelfasermembran lokalisiert ist. Dies ist ebenfalls bei Patienten mit Dysferlinopathie und Punktmutation der Fall (20, 21, 27). Diese Verfahren eignen sich daher zum Nachweis einer verminderten Dysferlinexpression in den untersuchten Tieren und gegebenenfalls zum Monitoring des Proteingehalts und der Lokalisation im Rahmen von Interventionsstudien.

6.2.4 Histologische Tests

Die Auswertung histologischer Merkmale hat sich als geeignetes, objektives Mittel erwiesen, um die Progredienz der Muskeldystrophie bei MMex38-Mäusen zu ermitteln. Bei Patienten mit Dysferlinopathie wurde die Schwere der histopathologischen Ausprägung zwischen der Sarcoglycanopathie und der Duchenne-Muskeldystrophie angesiedelt und damit als stark ausgeprägt eingeschätzt (28). Während in den gesunden Wildtyp-Kontrollen der Muskelfaserdurchmesser bei ca. 50-60 µm gemessen wurde, war er in der MMex38-Maus im Durchschnitt um 20-30 µm geringer. Diese Linksverschiebung sowie die Varianz der Muskelfasergröße wurde auch bei Patienten mit Dysferlinopathie nachgewiesen (28). Übereinstimmend wurde bei der SJL/J-Maus ab einem Alter von 35 Wochen sowohl eine Varianz der Fasergröße, wie auch muskuläre Atrophie histologisch belegt (29).

Im gesunden Muskel liegen die Zellkerne der Muskelfasern randständig. Sie verlagern sich nur bei Regeneration (neue, regenerative Faser) oder Muskelfaserumbau nach Beschädigung ins Zellinnere. Sie sind daher ein Zeichen von vermehrtem Umbau und/oder gestörter Zellarchitektur. Ein erhöhter Anteil von Fasern mit zentralisiertem Zellkern wurde für das MMex38-Mausmodell sowohl im M. quadriceps als auch im M. tibialis anterior bereits mit zwölf Wochen nachgewiesen und der Anteil war mit zunehmendem Alter der Versuchstiere progredient. In SJL/J-Mäusen sind binnenständige Nuklei ein frühes histologisches Merkmal der Muskeldystrophie (69). Auch bei mdx-Mäusen sind zentralisierte Zellkerne ein charakteristisches diagnostisches Merkmal für die Progredienz der Erkrankung (129).

Disseminierte Nekrosen sind Zeichen des Untergangs der Muskelfaser. Im gesunden Muskel sollten keine nekrotischen Fasern auftreten. Der eindeutige Nachweis nekrotischer Fasern im MMex38-Mausmodell hat das Vorhandensein einer muskulären

Dystrophie bestätigt. Die prozentuale Quantifizierung hat es darüber hinaus ermöglicht, eine Einteilung der Schwere der Erkrankung vorzunehmen und somit den progredienten Krankheitsverlauf darzulegen. Nekrotische Fasern können in verschiedenen Mausmodellen für die Dysferlinopathie, wie der *Dysf*^{-/-}-Maus und der A/J-Maus ab einem Alter von fünf Monaten nachgewiesen werden (50). Für die Duchenne-Muskeldystrophie wurden nekrotische Fasern als früher histologischer Parameter sowohl im Patienten, als auch in dystrophindefizienten Mäusen und Hunden beschrieben (129-131).

Mausmodell	Histologie
SJL/J-Maus	1 Monat: Milde myopathische Läsionen (Fasern mit geringem Durchmesser und zentralisierte Nuklei) 6-8 Monate: Fettgewebiger/bindegewebiger Umbau und Inflammation 10 Monate: Muskelfaseratrophie 16 Monate: Fettgewebiger Umbau der Muskulatur zu ca. 50 % (67)
A/J-Maus	4-5 Monate: Erste histologische Veränderungen in Form von degenerativen und regenerativen Fasern, Fasern mit zentralisiertem Zellkern. Histologischer Verlauf wie <i>Dysf</i> ^{-/-} -Maus, jedoch langsamere Progression (50)
<i>Dysf</i> ^{-/-} -Maus (B6.129Dysf ^{tm1Kcam/J})	2 Monate: Erste histologische Veränderungen in Form von degenerativen und regenerativen Fasern, Fasern mit zentralisiertem Zellkern 5 Monate: Vermehrt nekrotische und regenerierende Fasern, Infiltration mononuklearer Zellen, Phagozytose, Varianz des Faserdurchmessers, hypertrophe Fasern, „Fiber-Splitting“, fettgewebiger Umbau 8 Monate: Perivaskuläre Infiltrate, endomysiale Fibrose, Inflammation (50)
B10.SJL- <i>Dysfim</i> /AwaJ-Maus	4 Wochen: Erste histologische Veränderungen 8 Monate: Starke Ausprägung in Form von fettgewebigem/fibrotischem Umbau und Inflammation (132)
Bla/J-Maus (B6.A- <i>Dysf</i> ^{prmd} /GeneJ)	2 Monate: Zentralisierte Nuklei und Inflammation 4 Monate: Histopathologische Progredienz und Befall der Mehrheit der Muskeln (55)

Tab. 14: Histologische Merkmale verschiedener Mausmodelle für die Dysferlinopathie

Die LGMD2B kennzeichnet sich durch intramuskuläre Inflammation. Auch im MMex38-Mausmodell konnten ab einem Alter von zwölf Wochen entzündliche Veränderungen nachgewiesen werden. Eine Quantifizierung der entzündlichen Infiltrate wäre möglich, um das Krankheitsstadium festzulegen (28, 133). Weiterführend könnte durch Antikörperfärbungen bestimmt werden, ob im Mausmodell wie bei dysferlindefizienten Patienten Monozyten und T-Zellen in den entzündlichen Infiltraten vorherrschend sind (31).

Eine Vielzahl an Proteinen wurde bei der Bildung von Amyloid als krankheitsauslösend identifiziert (134). Alle Fibrillentypen weisen letztendlich jedoch eine ähnliche Ultrastruktur auf (135). Amyloidosen können so gut wie jedes Organsystem betreffen (136). Es erkranken vor allem ältere Menschen, da die langwierige, fortschreitende Akkumulation einen Zelluntergang und Zerstörung der Gewebestruktur bewirkt (137). Die Dysferlinopathie ist die einzige Muskeldystrophie bei der Amyloid im Muskel nachgewiesen wurde. Die betroffenen Patienten trugen eine Mutationen in der N-terminalen Region des Dysferlings (30). Diese Amyloidablagerungen enthielten Dysferlin und werden daher auf die Akkumulation von fehlerhaft gefalteten Dysferlin zurückgeführt. Bei zwölf und zwanzig Wochen alten MMex38-Tieren konnten wir keine Amyloidbildung detektieren. Der späte Nachweis von Amyloid in einigen sechzig Wochen alten MMex38-Mäusen legt dar, dass die amyloide Formation ein langwieriger Prozess ist und erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium auftritt. Ebenfalls lässt sich folgern, dass die intrazellulären Mechanismen, die durch fehlgefaltetes Dysferlin im Mausmodell induziert werden, mit denen im menschlichen Organismus vergleichbar sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die histologischen Merkmale in der MMex38-Maus grundlegend mit der Muskelpathologie im Patienten vergleichbar waren und noch vor dem Vorhandensein von funktionellen Einschränkungen nachgewiesen werden konnten. Die pathologischen Veränderungen nehmen mit dem Alter der Maus und dem Fortschreiten des Krankheitsprozesses zu und dienen daher als sicherer Krankheitsprogressionsnachweis. Weiterhin zeigten sich bei der Analyse der MMex38-Muskeln Spezifika, die auf die Proteinefehlfaltung aufgrund der Punktmutation im Dysferlingen zurückzuführen sind und dieses Mausmodell klar von anderen Knockoutmodellen für die Dysferlinopathie unterscheiden. Zudem reflektieren die nachgewiesenen Veränderungen jene bei Patienten mit entsprechenden Mutationen (30, 46). Die Analyse der Muskelhistologie ist demnach ein geeignetes und essentielles Verfahren um Effekte verschiedener therapeutischer Strategien auf die Muskulatur zu evaluieren.

6.2.5 Ketogene Diät

Wir haben verschiedene Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* durchgeführt, in der Maus und am Menschen, die darauf hinweisen, dass bei Dyferlindefizienz die Glukoseverwertung im Muskel gestört ist. Um die Bedeutung einer Glukoseverwertungsstörung für den muskeldystrophischen Prozess zu evaluieren, wurde eine Ernährungsinterventionsstudie durchgeführt. Gleichzeitig lassen die Ergebnisse dieser Interventionsstudie aber auch Rückschlüsse auf die Eignung dieses Tiermodells für eine derartige Untersuchung zu.

Die Ergebnisse des Ausdauertests mit dem Laufband, lassen eine Verbesserung der funktionellen Leistungsfähigkeit der MMex38-Mäuse durch die Nahrungsumstellung vermuten. Die ketogen ernährten MMex38-Tiere liefen in etwa die gleiche Distanz wie die ketogen ernährten Wildtyp-Kontrollen. Auch im Vergleich zu den mit Standardfutter ernährten MMex38-Mäusen war eine Zunahme der Ausdauerleistung zu beobachten. Das Leistungsniveau von Wildtyp-Mäusen die Standardnahrung erhielten, konnte jedoch von beiden Gruppen nicht erreicht werden. Darüberhinaus schien die Wildtyp-Kontrollgruppe durch die Nahrungsumstellung eine Verschlechterung ihrer Leistungsfähigkeit zu entwickeln. Bereits ab dem ersten Belastungstag war die Laufdistanz kürzer als die der Kontrollgruppe. Dies kann durch einen Leistungsabfall durch die reduzierten Glykogenspeicher der Muskulatur und die verringerte Aktivität glykolytisch aktiver Enzyme bedingt gewesen sein (127). Durch die kurzen Intervalle der Belastungseinheiten und der Tatsache, dass keine glukosehaltige Nahrung bereitgestellt wurde, schienen die Glukosespeicher der Muskeln, die nötig wären um die geforderte Leistung zu erbringen, nicht aufgefüllt worden zu sein. Da die MMex38-Mäuse durch die Umstellung der Ernährung jedoch eine bessere Leistung vollbrachten, lässt sich annehmen, dass die Glykolyse bei den dysferlindefizienten Tieren auch unter gemischter Nahrungszufuhr nicht die primäre Energiegewinnung darstellt und es früh zur Umstellung auf andere energieliefernde Stoffwechselwege wie der Lipolyse kommt. Wenn dann die energieliefernden Substrate gesteigert werden, kann der Muskel mehr Energie herstellen und die Leistungsfähigkeit erhöhen.

Eine kohlenhydratarme Diät ist bereits im Mausmodell für die mitochondriale Myopathie getestet worden. In den Versuchstieren kam es zu einer Verlangsamung des Krankheitsprogresses und einer Verbesserung metabolischer Parameter (138). Die Auswirkungen der Diät wurden daher ebenfalls am Patienten getestet. In fünf Patienten

mit mitochondrialer Myopathie kam es jedoch bereits innerhalb von Tagen zur Verschlechterung der Muskelsymptome und histologisch konnte eine Zunahme der Mitochondrialen Myopathie dargestellt werden (139).

In der MMex38-Maus wurde histopathologisch im M. quadriceps durch die ketogene Diät eine Zunahme der nekrotischen Fasern sowie eine leichte Faseratrophie induziert. Im M. tibialis anterior kam es zu einer Abnahme der Fasern mit zentralisiertem Zellkern. Darüber hinaus zeigten sich keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den standardernährten MMex38-Tieren. Die Analyse der Muskelhistologie lässt demnach keine einheitlichen Schlüsse auf den Effekt der Ernährungsintervention zu.

Funktionell zeigte sich bei den MMex38-Mäusen durch die ketogene Diät eine Verbesserung der Ausdauerleistung, bzw. eine nicht veränderte Ausdauerleistung bei gleichzeitigem Leistungseinbruch der Wildtyp-Kontrollgruppe.

Wie bereits dargestellt, unterscheiden sich der murine und der humane Muskelstoffwechsel. Unter anderem ist die Muskelfaserverteilung eine andere. Durch die Ernährungsumstellung wäre vor allem der Muskelstoffwechsel in Typ-II-Fasern beeinflusst. Letztlich kann nur eine Interventionsstudie am Menschen eindeutige Ergebnisse liefern, inwieweit sich eine ketogene Ernährung positiv auf die muskuläre Funktion bei Dysferlinopathie auswirken kann. Eine Ernährungsumstellung stellt kein größeres Risiko für den Patienten dar. Nichtinvasive Methoden wie die Untersuchung in der Stoffwechselkammer in Ruhe und unter Belastung würden sich hier zunächst anbieten und sind in unserem Institut möglich. Aufgrund der nicht ganz eindeutigen Ergebnisse durch die Intervention im Mausmodell würde man zunächst erst einmal eine zeitlich begrenzte, medizinisch überwachte Ernährungsumstellung bevorzugen.

6.3 Tierversuche in der Wirkstoffentwicklung

Therapierrelevante Forschung muss stets zum Ziel haben, nichttherapierbare Erkrankungen behandelbar zu machen oder bestehende Therapien zu verbessern. Dies muss im Sinne der Patienten und unter strenger Abwägung aller ethischen Aspekte erfolgen. Insbesondere wenn es sich um tierexperimentelle Forschung handelt.

Die Untersuchung verschiedener Verfahren *in vivo* an geeigneten Tiermodellen ist ein essentieller Schritt im Rahmen der Entwicklung therapeutischer Strategien nach *in vitro*-Testungen und vor Anwendung am Patienten. Dies gilt zum Einen für die Validierung

therapeutischer Effekte *in vivo* (Pharmakodynamik), als auch für die Untersuchung pharmakokinetischer Aspekte insbesondere bei neueren Substanzen.

Für die *in vitro*-Untersuchung ist es bei Muskelspezifischen Untersuchungen möglich, humane primäre Myotuben zu verwenden. Durch die Zellfusion verschmelzen einkernige Myoblasten (isolierbar aus Muskelbiopsien, vermehrbar in Kultur) zu den mehrkernigen Myotuben. Diese stellen ein Zwischenstadium bei der Entwicklung der Muskelfasern dar. Ihre sarkomere Struktur ist jedoch noch abweichend von der einer voll entwickelten Muskelzelle. *In vivo*-Untersuchungen im Tiermodell bieten den Vorteil, dass Auswirkungen einer Intervention auf die ausgereiften Muskelzellen und den gesamten Muskel untersucht werden können.

In Bezug auf die Dysferlinopathie ist weiterhin bedeutend, dass es sich bei der Membranreparatur um einen komplexen Prozess handelt, der nicht ausschließlich die beschädigte Muskelfaser betrifft, sondern auch umliegende Strukturen mit einbezieht. Dieses Zusammenspiel kann bei *in vivo*-Untersuchungen mitbeurteilt werden.

Darüber hinaus können durch Tierversuche eventuelle Nebenwirkungen und weitere pharmakokinetische Aspekte, wie zum Beispiel Applikationsform und Dosis ermittelt werden um somit am Patienten die effektivste und nebenwirkungsärmste Therapieform zu untersuchen.

An Myoblasten von Patienten mit Punktmutation im Dysferlingen konnte *in vitro* durch die Anwendung kurzer Dysferlinpeptide und durch Applikation des Proteasominhibitors Bortezomib, über die Hemmung des vorzeitigen Abbaus, das endogene, fehlgefaltete Dysferlin an die Muskelmembran verlagert werden. In beiden Fällen zeigte sich eine verbesserte Membranreparatur (63, 71). Damit wurde nachgewiesen, dass fehlgefaltetes Dysferlin an der Muskelfasermembran funktionsfähig ist. Daraus ergeben sich spezifische Therapieansätze, die auf den Erhalt des punktmultierten Dysferlins abzielen.

Die Anwendung solcher Ansätze sollte zunächst in tierexperimentellen Studien überprüft werden. Zu schnell durchgeführte klinische Studien bieten diverse Risiken. Mangelnde Kenntnis bezüglich der Toxizität, Wirkstoffdosis und Wirkstoffintervalle stellt ein ethisches Problem und ein teilweise vermeidbares Risiko für den Patienten dar.

Kürzlich erst wurde auf Grund fehlerhafter Daten eine Veröffentlichung zurückgezogen, bei der, in Ermangelung eines Mausmodells mit Proteinfehlfaltung für die Dysferlinopathie, die intravenöse und subkutane Applikation von Bortezomib direkt *in vivo* an drei Patienten mit dysferlindefizienter Muskeldystrophie getestet wurde (64). Bortezomib wird derzeit in der Therapie des multiplen Myeloms eingesetzt (140). Eine häufige Nebenwirkung ist die dosisabhängige periphere Neuropathie (141, 142). Um die Vorteile von Bortezomib gegen mögliche Nebenwirkungen abzuwägen, wäre es sinnvoll gewesen, zuvor die Effektivität der Therapie über einen längeren Zeitraum *in vivo* in einem geeigneten Mausmodell zu testen. Dieser Weg über ein Tiermodell sollte falls möglich immer gewählt werden.

Es muss zunehmend davon ausgegangen werden, dass bei neuen Therapieformen zukünftig mutationsspezifische Behandlungen erforscht und zugelassen werden. Bei der Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie kam es kürzlich zur Zulassung des Wirkstoffes Ataluren. Dieser bewirkt das Überspringen eines Stoppcodons und ist damit speziell bei *nonsense*-Mutationen bei der Duchenne-Muskeldystrophie einsetzbar (143). Die CRISP/Cas-Methode beschreibt ein Verfahren mit dem Gene und Nukleotide gezielt eingefügt oder ausgeschnitten werden können (144, 145). Hierdurch konnte die benötigte Zeit zur Generierung von Mausmodellen mit komplexen Genomveränderung von Jahren auf Wochen reduziert werden (146). Zukünftig wird es mit neuen gentechnischen Methoden noch einfacher werden passgenaue Tiermodelle zeitnah zu entwickeln.

6.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das MMex38 Mausmodell alle Zeichen eine Dysferlinopathie entwickelt und die Charakteristika für eine Proteinfehlfaltungserkrankung aufweist. Fehlerhaftes Dysferlin ist im Muskelgewebe nachweisbar, aber stark reduziert. Es zeigt nicht das sonst typische membranständige Lokisationsmuster. Die histopathologischen Parameter sind im Mausmodell ab einem Alter von zwölf Wochen nachweisbar und nehmen mit steigendem Lebensalter zu. Sie zeigen demnach einen progredienten Krankheitsverlauf. Zudem konnte im Muskel älterer Mäuse die Ablagerung von amyloiden Fibrillen nachgewiesen werden. Die MMex38-Maus ist weiterhin durch eine Zunahme des Körpergewichts bei gleichzeitiger

Abnahme der Muskelmasse und histologischer Muskelatrophie charakterisiert. Eine beeinträchtigte Membranreparatur konnte durch den international anerkannten Laserwoundingassay nachgewiesen werden.

Eine ketogene Nahrungsumstellung führte teilweise zu Veränderungen in der Muskelhistologie mit vereinzelter Zunahmen der Histopathologie und gleichzeitig zu einer verbesserten Ausdauerleistung auf dem Laufband. Die Intervention führt demnach zu signifikant evaluierbaren Veränderungen einzelner Mausmodell-Charakteristika.

Die MMex38-Maus ist demnach das erste Mausmodell mit Proteinfehlfaltung für die Dysferlinopathie und eignet sich für die Evaluation von Therapieansätzen für die, durch Punktmutation ausgelösten Dysferlinopathien *in vivo* und ermöglicht so wichtige Untersuchungen im Rahmen translationaler Forschung.

7 Literaturverzeichnis

1. Nigro V, Savarese M. Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myol.* 2014;33(1):1-12.
2. Bashir R, Strachan T, Keers S, Stephenson A, Mahjneh I, Marconi G, Nashef L, Bushby KM. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Hum Mol Genet.* 1994;3(3):455-7.
3. Bejaoui K, Hirabayashi K, Hentati F, Haines JL, Ben Hamida C, Belal S, Miller RG, McKenna-Yasek D, Weissenbach J, Rowland LP. Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14. *Neurology.* 1995;45(4):768-72.
4. Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizberea JA, Hentati F, Hamida MB, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ, Brown RH. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1998;20(1):31-6.
5. Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, Richard I, Marchand S, Bourg N, Argov Z, Sadeh M, Mahjneh I, Marconi G, Passos-Bueno MR, Moreira EeS, Zatz M, Beckmann JS, Bushby K. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet.* 1998;20(1):37-42.
6. Tagawa K, Ogawa M, Kawabe K, Yamanaka G, Matsumura T, Goto K, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK. Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients. *J Neurol Sci.* 2003;211(1-2):23-8.
7. Argov Z, Sadeh M, Mazor K, Soffer D, Kahana E, Eisenberg I, Mitrani-Rosenbaum S, Richard I, Beckmann J, Keers S, Bashir R, Bushby K, Rosenmann H. Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews. Clinical and genetic features. *Brain.* 2000;123 (Pt 6):1229-37.
8. Vilchez JJ, Gallano P, Gallardo E, Lasa A, Rojas-García R, Freixas A, De Luna N, Calafell F, Sevilla T, Mayordomo F, Baiget M, Illa I. Identification of a novel founder mutation in the *DYSF* gene causing clinical variability in the Spanish population. *Arch Neurol.* 2005;62(8):1256-9.

9. Cagliani R, Magri F, Toscano A, Merlini L, Fortunato F, Lamperti C, Rodolico C, Prella A, Sironi M, Aguenouz M, Ciscato P, Uncini A, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. Mutation finding in patients with dysferlin deficiency and role of the dysferlin interacting proteins annexin A1 and A2 in muscular dystrophies. *Hum Mutat.* 2005;26(3):283.
10. Achanzar WE, Ward S. A nematode gene required for sperm vesicle fusion. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 9):1073-81.
11. Lek A, Evesson FJ, Sutton RB, North KN, Cooper ST. Ferlins: regulators of vesicle fusion for auditory neurotransmission, receptor trafficking and membrane repair. *Traffic.* 2012;13(2):185-94.
12. Davis DB, Doherty KR, Delmonte AJ, McNally EM. Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. *J Biol Chem.* 2002;277(25):22883-8.
13. Kobayashi K, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Dysferlin and animal models for dysferlinopathy. *J Toxicol Pathol.* 2012;25(2):135-47.
14. Kerr JP, Ziman AP, Mueller AL, Muriel JM, Kleinhans-Welte E, Gumerson JD, Vogel SS, Ward CW, Roche JA, Bloch RJ. Dysferlin stabilizes stress-induced Ca²⁺ signaling in the transverse tubule membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(51):20831-6.
15. McNeil PL, Khakee R. Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage. *Am J Pathol.* 1992;140(5):1097-109.
16. Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, McNeil PL, Campbell KP. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature.* 2003;423(6936):168-72.
17. Nguyen K, Bassez G, Bernard R, Krahn M, Labelle V, Figarella-Branger D, Pouget J, Hammouda eH, Bérout C, Urtizbera A, Eymard B, Leturcq F, Lévy N. Dysferlin mutations in LGMD2B, Miyoshi myopathy, and atypical dysferlinopathies. *Hum Mutat.* 2005;26(2):165.
18. Krahn M, Bérout C, Labelle V, Nguyen K, Bernard R, Bassez G, Figarella-Branger D, Fernandez C, Bouvenot J, Richard I, Ollagnon-Roman E, Bevilacqua JA, Salvo E, Attarian S, Chapon F, Pellissier JF, Pouget J, Hammouda eH, Laforêt P, Urtizbera JA, Eymard B, Leturcq F, Lévy N. Analysis of the DYSF mutational spectrum in a large cohort of patients. *Hum Mutat.* 2009;30(2):E345-75.
19. Blandin G, Beroud C, Labelle V, Nguyen K, Wein N, Hamroun D, Williams B, Monnier N, Rufibach LE, Urtizbera JA, Cau P, Bartoli M, Lévy N, Krahn M. UMD-

DYSF, a novel locus specific database for the compilation and interactive analysis of mutations in the dysferlin gene. *Hum Mutat.* 2012;33(3):E2317-31.

20. Fujita E, Kouroku Y, Isoai A, Kumagai H, Misutani A, Matsuda C, Hayashi YK, Momoi T. Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum Mol Genet.* 2007;16(6):618-29.

21. Evesson FJ, Peat RA, Lek A, Brilot F, Lo HP, Dale RC, Parton RG, North KN, Cooper ST. Reduced plasma membrane expression of dysferlin mutants is attributed to accelerated endocytosis via a syntaxin-4-associated pathway. *J Biol Chem.* 2010;285(37):28529-39.

22. Cenacchi G, Fanin M, De Giorgi LB, Angelini C. Ultrastructural changes in dysferlinopathy support defective membrane repair mechanism. *J Clin Pathol.* 2005;58(2):190-5.

23. Huang Y, Laval SH, van Remoortere A, Baudier J, Benaud C, Anderson LV, Straub V, Deelder A, Frants RR, den Dunnen JT, Bushby K, van der Maarel SM. AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. *FASEB J.* 2007;21(3):732-42.

24. Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RH. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem.* 2003;278(50):50466-73.

25. McNeil PL, Vogel SS, Miyake K, Terasaki M. Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 11):1891-902.

26. McDade JR, Archambeau A, Michele DE. Rapid actin-cytoskeleton-dependent recruitment of plasma membrane-derived dysferlin at wounds is critical for muscle membrane repair. *FASEB J.* 2014;28(8):3660-70.

27. Piccolo F, Moore SA, Ford GC, Campbell KP. Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies. *Ann Neurol.* 2000;48(6):902-12.

28. Fanin M, Angelini C. Muscle pathology in dysferlin deficiency. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2002;28(6):461-70.

29. Kobayashi K, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. The distribution and characterization of skeletal muscle lesions in dysferlin-deficient SJL and A/J mice. *Exp Toxicol Pathol.* 2010;62(5):509-17.

30. Spuler S, Carl M, Zabojszcza J, Straub V, Bushby K, Moore SA, Bähring S, Wenzel K, Vinkemeier U, Rocken C. Dysferlin-deficient muscular dystrophy features amyloidosis. *Ann Neurol*. 2008;63(3):323-8.
31. Yin X, Wang Q, Chen T, Niu J, Ban R, Liu J, Mao Y, Pu C. CD4+ cells, macrophages, MHC-I and C5b-9 involve the pathogenesis of dysferlinopathy. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(3):3069-75.
32. Andrews NW. Membrane repair and immunological danger. *EMBO Rep*. 2005;6(9):826-30.
33. Grounds MD, Terrill JR, Radley-Crabb HG, Robertson T, Papadimitriou J, Spuler S, Shavlakadze T. Lipid accumulation in dysferlin-deficient muscles. *Am J Pathol*. 2014;184(6):1668-76.
34. Liu F, Lou J, Zhao D, Li W, Zhao Y, Sun X, Yan C. Dysferlinopathy: mitochondrial abnormalities in human skeletal muscle. *Int J Neurosci*. 2015.
35. Lostal W, Bartoli M, Roudaut C, Bourg N, Krahn M, Pryadkina M, Borel P, Suel L, Roche JA, Stockholm D, Bloch RJ, Levy N, Bashir R, Richard I. Lack of correlation between outcomes of membrane repair assay and correction of dystrophic changes in experimental therapeutic strategy in dysferlinopathy. *PLoS One*. 2012;7(5):e38036.
36. Aoki M, Liu J, Richard I, Bashir R, Britton S, Keers SM, Oeltjen J, Brown HE, Marchand S, Bourg N, Beley C, McKenna-Yasek D, Arahata K, Bohlega S, Cupler E, Illa I, Majneh I, Barohn RJ, Urtizbera JA, Fardeau M, Amato A, Angelini C, Bushby K, Beckmann JS, Brown RH. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology*. 2001;57(2):271-8.
37. Angelini C, Peterle E, Gaiani A, Bortolussi L, Borsato C. Dysferlinopathy course and sportive activity: clues for possible treatment. *Acta Myol*. 2011;30(2):127-32.
38. Passos-Bueno MR, Cerqueira A, Vainzof M, Marie SK, Zatz M. Myotonic dystrophy: genetic, clinical, and molecular analysis of patients from 41 Brazilian families. *J Med Genet*. 1995;32(1):14-8.
39. Xi J, Blandin G, Lu J, Luo S, Zhu W, Bérout C, Pécheux C, Labelle V, Lévy N, Urtizbera JA, Zhao C, Krahn M. Clinical heterogeneity and a high proportion of novel mutations in a Chinese cohort of patients with dysferlinopathy. *Neurol India*. 2014;62(6):635-9.
40. Ueyama H, Kumamoto T, Horinouchi H, Fujimoto S, Aono H, Tsuda T. Clinical heterogeneity in dysferlinopathy. *Intern Med*. 2002;41(7):532-6.

41. Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Tanaka H, Vereshchagin NV, Markova ED, Poleshchuk VV, Lozhnikova SM, Sukhorukov VS, Limborska SA, Slominsky PA, Bulayeva KB, Tsuji S. Clinical and molecular analysis of a large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy. *Brain*. 1996;119 (Pt 6):1895-909.
42. Woudt L, Di Capua GA, Krahn M, Castiglioni C, Hughes R, Campero M, Trangulao A, González-Hormazábal P, Godoy-Herrera R, Lévy N, Urtizbera JA, Jara L, Bevilacqua JA. Toward an objective measure of functional disability in dysferlinopathy. *Muscle Nerve*. 2016;53(1):49-57.
43. Chase TH, Cox GA, Burzenski L, Foreman O, Shultz LD. Dysferlin deficiency and the development of cardiomyopathy in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *Am J Pathol*. 2009;175(6):2299-308.
44. Nguyen K, Bassez G, Krahn M, Bernard R, Laforêt P, Labelle V, Urtizbera JA, Figarella-Branger D, Romero N, Attarian S, Leturcq F, Pouget J, Lévy N, Eymard B. Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol*. 2007;64(8):1176-82.
45. Klinge L, Aboumoussa A, Eagle M, Hudson J, Sarkozy A, Vita G, Charlton R, Roberts M, Straub V, Barresi R, Lochmüller H, Bushby K. New aspects on patients affected by dysferlin deficient muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81(9):946-53.
46. Wenzel K, Geier C, Qadri F, Hubner N, Schulz H, Erdmann B, Gross V, Bauer D, Dechend R, Dietz R, Osterziel KJ, Spuler S, Ozcelik C. Dysfunction of dysferlin-deficient hearts. *J Mol Med (Berl)*. 2007;85(11):1203-14.
47. Choi ER, Park SJ, Choe YH, Ryu DR, Chang SA, Choi JO, Lee SC, Park SW, Kim BJ, Kim DK, Oh JK. Early detection of cardiac involvement in Miyoshi myopathy: 2D strain echocardiography and late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2010;12:31.
48. Han R, Rader EP, Levy JR, Bansal D, Campbell KP. Dystrophin deficiency exacerbates skeletal muscle pathology in dysferlin-null mice. *Skelet Muscle*. 2011;1(1):35.
49. Nishikawa A, Mori-Yoshimura M, Segawa K, Hayashi YK, Takahashi T, Saito Y, Nonaka I, Krahn M, Levy N, Shimizu J, Mitsui J, Kimura E, Goto J, Yonemoto N, Aoki M, Nishino I, Oya Y, Murata M. Respiratory and cardiac function in Japanese patients with dysferlinopathy. *Muscle Nerve*. 2016;53(3):394-401.

50. Ho M, Post CM, Donahue LR, Lidov HG, Bronson RT, Goolsby H, Watkins SC, Cox GA, Brown RH. Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency. *Hum Mol Genet.* 2004;13(18):1999-2010.
51. Confalonieri P, Oliva L, Andreetta F, Lorenzoni R, Dassi P, Mariani E, Morandi L, Mora M, Cornelio F, Mantegazza R. Muscle inflammation and MHC class I up-regulation in muscular dystrophy with lack of dysferlin: an immunopathological study. *J Neuroimmunol.* 2003;142(1-2):130-6.
52. Kostek CA, Dominov JA, Miller JB. Up-regulation of MHC class I expression accompanies but is not required for spontaneous myopathy in dysferlin-deficient SJL/J mice. *Am J Pathol.* 2002;160(3):833-9.
53. Tarnopolsky MA, Hatcher E, Shupak R. Genetic Myopathies Initially Diagnosed and Treated as Inflammatory Myopathy. *Can J Neurol Sci.* 2016:1-4.
54. Díaz J, Woudt L, Suazo L, Garrido C, Caviedes P, Cardenas AM, Castiglioni C, Bevilacqua JA. Broadening The Imaging Phenotype of Dysferlinopathy at Different Disease Stages. *Muscle Nerve.* 2016.
55. Lostal W, Bartoli M, Bourg N, Roudaut C, Bentaïb A, Miyake K, Guerchet N, Fougousse F, McNeil P, Richard I. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum Mol Genet.* 2010;19(10):1897-907.
56. Sondergaard PC, Griffin DA, Pozsgai ER, Johnson RW, Grose WE, Heller KN, Shontz KM, Montgomery CL, Liu J, Clark KR, Sahenk Z, Mendell JR, Rodino-Klapac LR. AAV.Dysferlin Overlap Vectors Restore Function in Dysferlinopathy Animal Models. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015;2(3):256-70.
57. Escobar H, Schöwel V, Spuler S, Marg A, Izsvák Z. Full-length Dysferlin Transfer by the Hyperactive Sleeping Beauty Transposase Restores Dysferlin-deficient Muscle. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2016;5:e277.
58. Pryadkina M, Lostal W, Bourg N, Charton K, Roudaut C, Hirsch ML, Richard I. A comparison of AAV strategies distinguishes overlapping vectors for efficient systemic delivery of the 6.2 kb Dysferlin coding sequence. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2015;2:15009.
59. Philippi S, Lorain S, Beley C, Peccate C, Précigout G, Spuler S, Garcia L. Dysferlin rescue by spliceosome-mediated pre-mRNA trans-splicing targeting introns harbouring weakly defined 3' splice sites. *Hum Mol Genet.* 2015;24(14):4049-60.

60. Suzuki N, Akiyama T, Takahashi T, Komuro H, Warita H, Tateyama M, Itoyama Y, Aoki M. Continuous administration of poloxamer 188 reduces overload-induced muscular atrophy in dysferlin-deficient SJL mice. *Neurosci Res.* 2012;72(2):181-6.
61. Marg A, Escobar H, Gloy S, Kufeld M, Zacher J, Spuler A, Birchmeier C, Izsvák Z, Spuler S. Human satellite cells have regenerative capacity and are genetically manipulable. *J Clin Invest.* 2014;124(10):4257-65.
62. Walter MC, Reilich P, Thiele S, Schessl J, Schreiber H, Reiners K, Kress W, Müller-Reible C, Vorgerd M, Urban P, Schrank B, Deschauer M, Schlotter-Weigel B, Kohnen R, Lochmüller H. Treatment of dysferlinopathy with deflazacort: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:26.
63. Azakir BA, Di Fulvio S, Kinter J, Sinnreich M. Proteasomal inhibition restores biological function of mis-sense mutated dysferlin in patient-derived muscle cells. *J Biol Chem.* 2012;287(13):10344-54.
64. Azakir BA, Erne B, Di Fulvio S, Stirnimann G, Sinnreich M. Proteasome inhibitors increase missense mutated dysferlin in patients with muscular dystrophy. *Sci Transl Med.* 2014;6(250):250ra112.
65. Study description: rAAVrh74.MHCK7.DYSF.DV for Treatment of Dysferlinopathies, [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov). (Accessed on May 23rd, 2017, at <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02710500?term=rAAVrh74.MHCK7.DYSF.DV&rank=1>.)
66. Information on the International Clinical Outcome Study for Dysferlinopathy by The Jain Foundation. (Accessed on May 23rd, 2017, at www.jain-foundation.org/dysferlinoutcomestudy.)
67. Bittner RE, Anderson LV, Burkhardt E, Bashir R, Vafiadaki E, Ivanova S, Raffelsberger T, Maerk I, Höger H, Jung M, Karbasiyan M, Storch M, Lassmann H, Moss JA, Davison K, Harrison R, Bushby KM, Reis A. Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Genet.* 1999;23(2):141-2.
68. Stavnezer J, Lasky JL, Ponzio NM, Scheid MP, Thorbecke GJ. Reticulum cell sarcomas of SJL mice have rearranged immunoglobulin heavy and light chain genes. *Eur J Immunol.* 1989;19(6):1063-9.
69. Weller AH, Magliato SA, Bell KP, Rosenberg NL. Spontaneous myopathy in the SJL/J mouse: pathology and strength loss. *Muscle Nerve.* 1997;20(1):72-82.

70. Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res.* 2002;42(4):517-25.
71. Schoewel V, Marg A, Kunz S, Overkamp T, Carrazedo RS, Zacharias U, Daniel PT, Spuler S. Dysferlin-peptides reallocate mutated dysferlin thereby restoring function. *PLoS One.* 2012;7(11):e49603.
72. Howard AC, McNeil AK, McNeil PL. Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. *Nat Commun.* 2011;2:597.
73. Howard AC, McNeil AK, Xiong F, Xiong WC, McNeil PL. A novel cellular defect in diabetes: membrane repair failure. *Diabetes.* 2011;60(11):3034-43.
74. The European Commission's policy on rare diseases. Health Department of the European Commission (Accessed June 6th at https://ec.europa.eu/health/rare_diseases/policy_en.)
75. Information and positions on rare diseases by the German Bundesministerium für Gesundheit. (Accessed on June 20th, 2017, at <http://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/seltene-erkrankungen.html>.)
76. National plans or strategies for rare diseases by the Health Department of the European Commission (Accessed on June 6th, 2017, at https://ec.europa.eu/health/rare_diseases/national_plans/detailed_en.)
77. Information on The Jain Foundation's goals and mission by The Jain Foundation (Accessed on June 20th, 2017, <https://www.jain-foundation.org/about-us/mission>.)
78. Listing of active and past projects funded by The Jain Foundation (Accessed on June 20th, 2017, at <https://www.jain-foundation.org/scientific-resources/funded-projects>.)
79. Engek WK, Cunningham GG. Rapid Examination of Muscle Tissue. An Improved Trichrome Method for Fresh-Frozen Biopsy Sections. *Neurology.* 1963;13:919-23.
80. Puchtler H, Sweat F. Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J Histochem Cytochem.* 1965;13(8):693-4.
81. Bancroft JD. *Theory and Practice of Histologic Techniques.* 7th ed: Elsevier; 2013.
82. Marg A, Schoewel V, Timmel T, Schulze A, Shah C, Daumke O, Spuler S. Sarcolemmal repair is a slow process and includes EHD2. *Traffic.* 2012;13(9):1286-94.
83. Kennedy AR, Pissios P, Otu H, Roberson R, Xue B, Asakura K, Furukawa N, Marino FE, Liu FF, Kahn BB, Libermann TA, Maratos-Flier E. A high-fat, ketogenic diet

induces a unique metabolic state in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292(6):E1724-39.

84. Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med.* 2003;349(6):583-96.

85. Information on preclinical research by Treat-NMD, Neuromuscular Network. (Accessed on October 1st, 2017, at [http://www.treat-nmd.eu/research/preclinical/overview/.](http://www.treat-nmd.eu/research/preclinical/overview/))

86. Centers for Disease C, Prevention. Prevalence of Duchenne/Becker muscular dystrophy among males aged 5-24 years - four states, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009;58(40):1119-22.

87. The Jain Foundation's official Homepage. (Accessed on June 3rd, 2017, at <https://www.jain-foundation.org.>)

88. Link to The Tool Sharing Network by The Jain Foundation. (Accessed on October 1st, 2017, at <https://www.jain-foundation.org/scientific-resources/research-tools/tool-sharing-network.>)

89. Krahn M, Wein N, Bartoli M, Lostal W, Courier S, Bourg-Alibert N, Nguyen K, Vial C, Streichenberger N, Labelle V, DePetris D, Pecheux C, Leturcq F, Cau P, Richard I, Levy N. A naturally occurring human minidysferlin protein repairs sarcolemmal lesions in a mouse model of dysferlinopathy. *Sci Transl Med.* 2010;2(50):50ra69.

90. Lightfoot JT, Turner MJ, Daves M, Vordermark A, Kleeberger SR. Genetic influence on daily wheel running activity level. *Physiol Genomics.* 2004;19(3):270-6.

91. Bartling B, Al-Robaiy S, Lehnich H, Binder L, Hiebl B, Simm A. Sex-related differences in the wheel-running activity of mice decline with increasing age. *Exp Gerontol.* 2016.

92. Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie.* Germany: Thieme Verlagssgruppe; 2010. 944 p.

93. Hill AV, Lupton H. Muscular Exercise, Lactic Acid, and the Supply and Utilization of Oxygen. 1923.

94. Ayachi M, Niel R, Momken I, Billat VL, Mille-Hamard L. Validation of a Ramp Running Protocol for Determination of the True VO₂max in Mice. *Front Physiol.* 2016;7:372.

95. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2007;14(6):753-60.
96. Kemi OJ, Loennechen JP, Wisløff U, Ellingsen Ø. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* (1985). 2002;93(4):1301-9.
97. Minetti AE, Ardigò LP, Saibene F. Mechanical determinants of gradient walking energetics in man. *J Physiol.* 1993;472:725-35.
98. Pringle JS, Carter H, Doust JH, Jones AM. Oxygen uptake kinetics during horizontal and uphill treadmill running in humans. *Eur J Appl Physiol.* 2002;88(1-2):163-9.
99. Biondi O, Villemeur M, Marchand A, Chretien F, Bourg N, Gherardi RK, Richard I, Authier FJ. Dual effects of exercise in dysferlinopathy. *Am J Pathol.* 2013;182(6):2298-309.
100. Suhara T, Hishiki T, Kasahara M, Hayakawa N, Oyaizu T, Nakanishi T, Kubo A, Morisaki H, Kaelin WG, Jr., Suematsu M, Minamishima YA. Inhibition of the oxygen sensor PHD2 in the liver improves survival in lactic acidosis by activating the Cori cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(37):11642-7.
101. Hoshino D, Tamura Y, Masuda H, Matsunaga Y, Hatta H. Effects of decreased lactate accumulation after dichloroacetate administration on exercise training-induced mitochondrial adaptations in mouse skeletal muscle. *Physiol Rep.* 2015;3(9).
102. Forschungsgemeinschaft“ D. Tierversuche in der Forschung [http://www.dfg.de/download/pdf/dfg_magazin/forschungspolitik/tierschutz2015/dialogforum_terversuche/versuchstierkunde_und_refinement.pdf].
103. Taicher GZ, Tinsley FC, Reiderman A, Heiman ML. Quantitative magnetic resonance (QMR) method for bone and whole-body-composition analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2003;377(6):990-1002.
104. Jones AS, Johnson MS, Nagy TR. Validation of quantitative magnetic resonance for the determination of body composition of mice. *Int J Body Compos Res.* 2009;7(2):67-72.
105. Schmalbruch H. [Types of fibers in the leg musculature of the mouse]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1967;79(1):64-75.
106. Moore MC, Connolly CC, Cherrington AD. Autoregulation of hepatic glucose production. *Eur J Endocrinol.* 1998;138(3):240-8.

107. Hanson RW, Garber AJ. Phosphoenolpyruvate carboxykinase. I. Its role in gluconeogenesis. *Am J Clin Nutr.* 1972;25(10):1010-21.
108. Bertoli S, Trentani C, Ferraris C, De Giorgis V, Veggiotti P, Tagliabue A. Long-term effects of a ketogenic diet on body composition and bone mineralization in GLUT-1 deficiency syndrome: a case series. *Nutrition.* 2014;30(6):726-8.
109. Freeman JM, Kossoff EH, Hartman AL. The ketogenic diet: one decade later. *Pediatrics.* 2007;119(3):535-43.
110. Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, Whitney A, Cross JH. The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* 2008;7(6):500-6.
111. Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Jhung S, Sun RP, De Vivo DC. Glut-1 deficiency syndrome: clinical, genetic, and therapeutic aspects. *Ann Neurol.* 2005;57(1):111-8.
112. Cervenka MC, Patton K, Eloyan A, Henry B, Kossoff EH. The impact of the modified Atkins diet on lipid profiles in adults with epilepsy. *Nutr Neurosci.* 2016;19(3):131-7.
113. Reddy ST, Wang CY, Sakhaee K, Brinkley L, Pak CY. Effect of low-carbohydrate high-protein diets on acid-base balance, stone-forming propensity, and calcium metabolism. *Am J Kidney Dis.* 2002;40(2):265-74.
114. Meidenbauer JJ, Ta N, Seyfried TN. Influence of a ketogenic diet, fish-oil, and calorie restriction on plasma metabolites and lipids in C57BL/6J mice. *Nutr Metab (Lond).* 2014;11:23.
115. Bielohuby M, Menhofer D, Kirchner H, Stoehr BJ, Müller TD, Stock P, Hempel M, Stemmer K, Pfluger PT, Kienzle E, Christ B, Tschöp MH, Bidlingmaier M. Induction of ketosis in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;300(1):E65-76.
116. Phinney SD, Bistrian BR, Wolfe RR, Blackburn GL. The human metabolic response to chronic ketosis without caloric restriction: physical and biochemical adaptation. *Metabolism.* 1983;32(8):757-68.
117. Phinney SD, Horton ES, Sims EA, Hanson JS, Danforth E, LaGrange BM. Capacity for moderate exercise in obese subjects after adaptation to a hypocaloric, ketogenic diet. *J Clin Invest.* 1980;66(5):1152-61.
118. Cahill GF. Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:1-22.

119. Webster CC, Noakes TD, Chacko SK, Swart J, Kohn TA, Smith JA. Gluconeogenesis during endurance exercise in cyclists habituated to a long-term low carbohydrate high-fat diet. *J Physiol*. 2016;594(15):4389-405.
120. Jornayvaz FR, Jurczak MJ, Lee HY, Birkenfeld AL, Frederick DW, Zhang D, Zhang XM, Samuel VT, Shulman GI. A high-fat, ketogenic diet causes hepatic insulin resistance in mice, despite increasing energy expenditure and preventing weight gain. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(5):E808-15.
121. Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, Golan R, Fraser D, Bolotin A, Vardi H, Tangi-Rozental O, Zuk-Ramot R, Sarusi B, Brickner D, Schwartz Z, Sheiner E, Marko R, Katorza E, Thiery J, Fiedler GM, Blüher M, Stumvoll M, Stampfer MJ, Group DIRCTD. Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med*. 2008;359(3):229-41.
122. Axen KV, Axen K. Very low-carbohydrate versus isocaloric high-carbohydrate diet in dietary obese rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14(8):1344-52.
123. Caton SJ, Yinglong B, Burget L, Spangler LJ, Tschöp MH, Bidlingmaier M. Low-carbohydrate high-fat diets: regulation of energy balance and body weight regain in rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(2):283-9.
124. Volek JS, Freidenreich DJ, Saenz C, Kunces LJ, Creighton BC, Bartley JM, Davitt PM, Munoz CX, Anderson JM, Maresh CM, Lee EC, Schuenke MD, Aerni G, Kraemer WJ, Phinney SD. Metabolic characteristics of keto-adapted ultra-endurance runners. *Metabolism*. 2016;65(3):100-10.
125. Lambert EV, Speechly DP, Dennis SC, Noakes TD. Enhanced endurance in trained cyclists during moderate intensity exercise following 2 weeks adaptation to a high fat diet. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1994;69(4):287-93.
126. Phinney SD, Bistrian BR, Evans WJ, Gervino E, Blackburn GL. The human metabolic response to chronic ketosis without caloric restriction: preservation of submaximal exercise capability with reduced carbohydrate oxidation. *Metabolism*. 1983;32(8):769-76.
127. Stellingwerff T, Spriet LL, Watt MJ, Kimber NE, Hargreaves M, Hawley JA, Burke LM. Decreased PDH activation and glycogenolysis during exercise following fat adaptation with carbohydrate restoration. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(2):E380-8.

128. Anderson JE, Ovalle WK, Bressler BH. Electron microscopic and autoradiographic characterization of hindlimb muscle regeneration in the mdx mouse. *Anat Rec.* 1987;219(3):243-57.
129. Muntoni F, Mateddu A, Marchei F, Clerk A, Serra G. Muscular weakness in the mdx mouse. *J Neurol Sci.* 1993;120(1):71-7.
130. GILBERT RK, HAWK WA. The incidence of necrosis of muscle fibers in Duchenne type muscular dystrophy. *Am J Pathol.* 1963;43:107-22.
131. Nguyen F, Cherel Y, Guigand L, Goubault-Leroux I, Wyers M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. *J Comp Pathol.* 2002;126(2-3):100-8.
132. von der Hagen M, Laval SH, Cree LM, Haldane F, Pocock M, Wappler I, Peters H, Reitsamer HA, Hoger H, Wiedner M, Oberndorfer F, Anderson LV, Straub V, Bittner RE, Bushby KM. The differential gene expression profiles of proximal and distal muscle groups are altered in pre-pathological dysferlin-deficient mice. *Neuromuscul Disord.* 2005;15(12):863-77.
133. Gallardo E, Rojas-García R, de Luna N, Pou A, Brown RH, Illa I. Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology.* 2001;57(11):2136-8.
134. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda S, Merlini G, Saraiva MJ, Westermark P. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid.* 2014;21(4):221-4.
135. Westermark P, Benson MD, Buxbaum JN, Cohen AS, Frangione B, Ikeda S, Masters CL, Merlini G, Saraiva MJ, Sipe JD. A primer of amyloid nomenclature. *Amyloid.* 2007;14(3):179-83.
136. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:333-66.
137. Connors LH, Sam F, Skinner M, Salinaro F, Sun F, Ruberg FL, Berk JL, Seldin DC. Heart Failure Resulting From Age-Related Cardiac Amyloid Disease Associated With Wild-Type Transthyretin: A Prospective, Observational Cohort Study. *Circulation.* 2016;133(3):282-90.
138. Ahola-Erkkilä S, Carroll CJ, Peltola-Mjösund K, Tulkki V, Mattila I, Seppänen-Laakso T, Oresic M, Tynismaa H, Suomalainen A. Ketogenic diet slows down mitochondrial myopathy progression in mice. *Hum Mol Genet.* 2010;19(10):1974-84.

139. Ahola S, Auranen M, Isohanni P, Niemisalo S, Urho N, Buzkova J, Velagapudi V, Lundbom N, Hakkarainen A, Muurinen T, Piirilä P, Pietiläinen KH, Suomalainen A. Modified Atkins diet induces subacute selective ragged-red-fiber lysis in mitochondrial myopathy patients. *EMBO Mol Med*. 2016;8(11):1234-47.
140. Ocio EM, Richardson PG, Rajkumar SV, Palumbo A, Mateos MV, Orłowski R, Kumar S, Usmani S, Roodman D, Niesvizky R, Einsele H, Anderson KC, Dimopoulos MA, Avet-Loiseau H, Mellqvist UH, Turesson I, Merlini G, Schots R, McCarthy P, Bergsagel L, Chim CS, Lahuerta JJ, Shah J, Reiman A, Mikhael J, Zweegman S, Lonial S, Comenzo R, Chng WJ, Moreau P, Sonneveld P, Ludwig H, Durie BG, Miguel JF. New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia*. 2014;28(3):525-42.
141. Richardson PG, Xie W, Mitsiades C, Chanan-Khan AA, Lonial S, Hassoun H, Avigan DE, Oaklander AL, Kuter DJ, Wen PY, Kesari S, Briemberg HR, Schlossman RL, Munshi NC, Heffner LT, Doss D, Esseltine DL, Weller E, Anderson KC, Amato AA. Single-agent bortezomib in previously untreated multiple myeloma: efficacy, characterization of peripheral neuropathy, and molecular correlations with response and neuropathy. *J Clin Oncol*. 2009;27(21):3518-25.
142. Reece DE, Sullivan D, Lonial S, Mohrbacher AF, Chatta G, Shustik C, Burris H, Venkatakrisnan K, Neuwirth R, Riordan WJ, Karol M, von Moltke LL, Acharya M, Zannikos P, Keith Stewart A. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of two doses of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;67(1):57-67.
143. Bushby K, Finkel R, Wong B, Barohn R, Campbell C, Comi GP, Connolly AM, Day JW, Flanigan KM, Goemans N, Jones KJ, Mercuri E, Quinlivan R, Renfroe JB, Russman B, Ryan MM, Tulinius M, Voit T, Moore SA, Lee Sweeney H, Abresch RT, Coleman KL, Eagle M, Florence J, Gappmaier E, Glanzman AM, Henricson E, Barth J, Elfring GL, Reha A, Spiegel RJ, O'donnell MW, Peltz SW, McDonald CM, GROUP P-G--DS. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve*. 2014;50(4):477-87.
144. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-21.
145. Ochiai H. Single-Base Pair Genome Editing in Human Cells by Using Site-Specific Endonucleases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):21128-37.

146. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013;153(4):910-8.

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Leonie Victoria Heidt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Proteinfehlfaltung als Ursache der Muskeldystrophie Dysferlinopathie: Das Mausmodell *Dysf-MMex38*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Danksagung

Es ist vollbracht und damit an der Zeit, mich bei all denjenigen Menschen zu bedanken, die mich während der Erarbeitung und Vollendung meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Simone Spuler für die Bereitstellung des Themas und Ihre wohlwollende Betreuung bedanken.

Mein besonderer Dank gebührt außerdem Frau Dr. med. Verena Schöwel, die mir stets hilfreich mit ihrem fundierten Fachwissen, ihren vielen Anregungen und ihrer endlosen Geduld bei meiner wissenschaftlichen Arbeit zur Seite stand.

Bei den Versuchsdurchführungen unterstützten mich kompetent und sorgfältig Frau Adrienne Rothe und Frau Stephanie Meyer-Liesener, auch ihnen gilt mein Dank.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, Frau Monika Löhlein-Heidt und Herrn Dr. med. Peter Heidt, sowie meinem Bruder, Herrn Johannes Heidt. Sie haben mir allzeit in dem Prozess Rückhalt gegeben und tatkräftig unterstützt und damit einen außerordentlichen Teil zur Fertigstellung meiner Doktorarbeit beigetragen.