

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Komplement-vermittelte Zellschädigung
als Pathomechanismus der
Dysferlin-defizienten Gliedergürteldystrophie**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Semjon Crispin Taubert

aus Bremen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. S. Spuler

2. Prof. Dr. Chr. Hübner

3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Von Moers

Datum der Promotion: 03.09.2010

Zusammenfassung

Die Dysferlin-defiziente Gliedergürteldystrophie Typ 2B (LGMD2B) gehört zu den hereditären Muskelerkrankungen, die zu schwerwiegender progredienter Schwäche der proximalen (LGMD2B) Skelett-Muskulatur führen. Histologisch finden sich neben den typischen Zeichen der Muskeldystrophie entzündliche zelluläre Infiltrate sowie Ablagerungen von Komplementfaktoren, deren Regulation darüber hinaus durch das Fehlen des membranständigen Komplement-Inhibitors CD55 (Decay Accelerating Factor) verändert ist. Um die Bedeutung des Komplementsystems für den Pathomechanismus der LGMD2B zu eruieren, wurde zunächst in einer Zellkultur humaner Muskelvorläufer-Zellen die Toxizität von Komplement auf Myoblasten und Myotuben von Muskelgesunden sowie LGMD2B-Patienten mit oder ohne Blockade von CD55 / CD59 untersucht. Hier zeigte sich anhand mikroskopischer Auswertung von den Zelltod anzeigenden Propidiumiodid-Signalen eine 2- bis 4-fach erhöhte Komplement-Empfindlichkeit von LGMD2B-Myotuben gegenüber Normalkontrollen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Empfindlichkeit nur zu einem geringen Teil von CD55 reguliert wird. Anschließend wurde eine Charakterisierung der Zellkultur in der FACS-Zytometrie versucht, um eine effektive Analyse bei hohem Zelldurchsatz zu etablieren. Hierbei traten die Grenzen der *in vitro* Methode bei der technischen Messung zutage, so dass anschließend der Transfer des pathophysiologischen Modells in ein *in vivo* System erfolgte. Im Dysferlin-defizienten SJL/J-Mausmodell wurde der Effekt der Behandlung mit homologem monoklonalen Antikörper gegen C5-Protein auf die Entwicklung der Muskeldystrophie geprüft. Die histologische Analyse zeigte anhand der Zahl nekrotischer Muskelfasern eine deutliche Verlangsamung der spontanen Progression der Muskeldystrophie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Studie zeigt erstmals die fundamentale Bedeutung komplement-vermittelter Zellschädigung in der Pathogenese der Dysferlin-defizienten Muskeldystrophie und weist auf eine potentielle Therapieoption für Patienten mit LGMD2B hin.

Schlagwörter:

Dysferlin-defiziente Gliedergürteldystrophie Typ 2B, SJL/J Mausmodell, Humane Myoblasten-Zellkultur, Humane Myotuben-Zellkultur, CD55, CD59, Komplementvermittelte Zellschädigung, C5-Komplement-Inhibition

Abstract

Hereditary limb-girdle muscular dystrophy 2B is characterised by Dysferlin-deficiency leading to severe progressive palsy of proximal musculature. Histological signs comprise dystrophy findings amongst inflammatory cellular infiltrates and complement deposits. Recently, complement regulation in LGMD2B has been found to be altered because of the lack of CD55 decay accelerating factor. The aim of this study was to elucidate the significance of the complement system in the pathogenesis of LGMD2B by investigating the toxicity of complement attack with and without inhibition of CD55 / CD59 on cultured muscle progenitor cells. Microscopic analysis showed 2-4 times elevated complement-susceptibility in myotubes of LGMD2B patients compared to normal controls. This susceptibility was shown to be only marginally regulated by CD55. Subsequently, cultured muscle progenitors cells were characterised in FACS-cytometry to allow for high-throughput cell analysis. As this method proved to be ineffective the pathogenetic model was transferred to *in vivo* investigation. SJL/J mice that suffer from Dysferlin-deficiency were treated with homologous anti-C5-antibody and screened for the dynamics of muscle dystrophy development. Histological analysis in terms of necrotic muscle fibre quantification showed marked slowing of dystrophic changes in muscle biopsies by complement-inhibition compared to normal controls. This study demonstrates for the first time the fundamental importance of complement regulation in Dysferlin-deficient muscle diseases and points to possible therapeutic options for LGMD2B patients.

Keywords:

Dysferlin-deficient Muscular Dystrophy 2B, SJL/J Mouse Model, Human Myoblast Cell Culture, Human Myotube Cell Culture, CD55, CD59, Complement-mediated Cytotoxicity, C5-Complement-Inhibition

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINFÜHRUNG.....	7
1.1 Einordnung und Klinik der Gliedergürteldystrophie Typ 2B.....	7
1.2 Histologische Veränderungen bei Muskeldystrophien.....	9
1.3 Molekulare Grundlagen von Dysferlinopathien.....	10
1.4 Grundlagen der Muskelregeneration und Myogenese.....	11
1.5 Komplement-vermittelte Pathologie der Dysferlinopathien.....	12
1.6 Regulation der komplement-vermittelten Zellschädigung.....	13
1.7 Modelle zur Erforschung von Dysferlinopathien.....	16
1.7.1 Humane Zellkulturen in Forschung und Therapie.....	17
1.7.2 Tierexperimentelle Modelle der Dysferlin-defizienten Muskeldystrophie.....	17
1.8 Rationale.....	19
2 MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1 Experimente in der Zellkultur.....	20
2.1.1 Patienten und Dysferlin-Mutationen.....	20
2.1.2 Chemikalien.....	22
2.1.3 Material und Geräte.....	25
2.1.4 Zellkultur.....	26
2.1.4.1 Auftauen von Myoblasten.....	26
2.1.4.2 Medienwechsel.....	27
2.1.4.3 Expandieren der Kultur.....	27
2.1.4.4 Einfrieren von Myoblasten.....	28
2.1.4.5 Differenzierung zu Myotuben.....	28
2.1.5 Mikroskopische Untersuchung.....	29
2.1.5.1 Komplement-Assay.....	29
2.1.5.2 Komplement-Assay mit CD55 / CD59-Antikörper.....	30
2.1.5.3 Statistische Analyse.....	32
2.1.6 Durchflusszytometrische Untersuchung.....	32
2.1.6.1 Präparation der Myotuben.....	32
2.1.6.2 Charakterisierung von Myotuben und Myoblasten im Zytometer.....	32
2.1.6.3 Präparation der Zellen für das Komplement-Assay.....	33
2.1.6.4 Kalibrierung und Einstellung des Zytometers.....	33
2.1.6.5 Messung der Komplement-Assays im Zytometer.....	35
2.1.6.6 Statistische Analyse.....	37
2.2 Experimente im Mausmodell.....	37

2.2.1 Chemikalien.....	38
Material und Geräte.....	40
2.2.2 Tiere.....	40
2.2.3 Spezifischer Antikörper, Isotypkontrolle und Behandlungskontrolle.....	41
2.2.4 Behandlungsschema und Injektion.....	41
2.2.5 Tötung, Dissektion und Konservierung.....	42
2.2.6 Färbung der Muskelschnitte.....	43
2.2.7 Histologische Auswertung.....	43
2.2.8 Statistische Analyse.....	44
3 ERGEBNISSE.....	46
3.1 Experimente in der Zellkultur.....	46
3.1.1 Mikroskopische Merkmale.....	46
3.1.2 Komplement-Assays in der Mikroskopie.....	48
3.1.2.1 Differentielle Wirkung von Komplement auf Zelltypen und Mutationen.....	51
3.1.2.2 Wirkung von Anti-CD55/59-Antikörpern unter Komplement-Attacke.....	56
3.2 Durchflusszytometrische Analyse.....	59
3.2.1 Morphologie von Zellen und Zellpopulationen.....	59
3.2.2 Komplement-Assays in der Durchflusszytometrie.....	62
3.3 Komplement-Blockade in vivo.....	68
3.3.1 Parameter der Muskeldystrophie.....	68
3.3.2 Gruppenunterschiede in den Dystrophieparametern.....	71
3.3.3 Effekt der Behandlung auf die Muskelfasernekrosen.....	75
3.3.4 Analyse der Muskelfasernekrosen.....	77
4 DISKUSSION.....	79
4.1 Myoblasten von LGMD2B-Patienten reagieren empfindlicher auf Komplement-Angriffe als Normalkontrollen.....	79
4.2 Myotuben von LGMD2B-Patienten reagieren empfindlicher auf Komplement-Angriffe als Normalkontrollen.....	81
4.3 Komplement-vermittelte Zellschädigung erklärt das klinische Bild von Gliedergürteldystrophien.....	82
4.4 LGMD2B-Patienten weisen funktionell sowohl eine CD55- als auch eine CD59-Defizienz auf.....	83
4.5 CD55-/CD59-Defizienz spielt für die komplement-vermittelte Zellschädigung von Myotuben eine untergeordnete Rolle.....	84
4.6 Funktionell relevante Schädigung von Myotuben kann durch Defizienz löslicher	

<u>Komplement-Regulatoren erklärt werden.....</u>	<u>86</u>
<u>4.7 C5-Komplement-Inhibition verzögert im Mausmodell Zeichen der dysferlin-defizienten Muskeldystrophie.....</u>	<u>87</u>
<u>4.8 Ausblick: Pathomechanismus der Muskeldystrophie in LGMD2B.....</u>	<u>89</u>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter (Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer)
LGMD	Limb Girdle Muscular Dystrophy (Gliedergürteldystrophie)
LGMD2B	Limb Girdle Muscular Dystrophy Typ 2 B → Dysferlin-defiziente Gliedergürteldystrophie
MAC	Membrane Attack Complex
PI	Propidiumiodid
PI+	Propidiumiodid-positiv

1 Einführung

1.1 Einordnung und Klinik der Gliedergürteldystrophie Typ 2B

Die Gruppe der Muskeldystrophien gehört zu den primären Muskelerkrankungen, bei denen der Pathomechanismus auf die Muskelzelle selbst zurückzuführen ist, ohne Beteiligung von Vorderhornzellen, peripherer Nerven oder der Funktion neuromuskulärer Verbindungen.

Gliedergürteldystrophien stellen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit der gemeinsamen Charakteristik der Schwäche von Schulter- und / oder Beckengürtelmuskulatur dar. Eine Einteilung der Muskeldystrophien erfolgte früher nach der klinischen Präsentation (Lokalisation der betroffenen Muskulatur oder dem Vererbungsmodus), heute erscheint eine Klassifikation anhand des betroffenen Gen-Lokus am sinnvollsten. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die derzeit bekannten Gliedergürteldystrophien.

Zu den autosomal-rezessiv vererbten Gliedergürteldystrophien (limb girdle muscular dystrophies type 2) gehören die sogenannten Dysferlinopathien, welche eine Veränderung im Dysferlin-Gen (DYSF) auf Chromosom 2p13 aufweisen^{1,2}. Mutationen im 55 Exone umspannenden, 150 Kilobasen großen DYSF-Gen treten nicht an einzelnen wenigen hot spots, sondern über das gesamte Gen verteilt auf^{3,4}.

Aus Dysferlin-Mutationen gehen zwei unterschiedliche Phänotypen hervor: die distal betonte Miyoshi-Myopathie (MM) sowie die proximal betonte limb-girdle muscular dystrophy 2B (LGMD2B)⁵⁻⁷. Beide Krankheitsentitäten können infolge derselben Mutation in derselben Familie vorkommen, wobei Geschwister aber häufig denselben Phänotyp entwickeln. Dies weist auf bisher unbekannte krankheitsmodifizierende Faktoren hin, die die Entwicklung zu einem bestimmten Phänotyp hin beeinflussen. Zuletzt wurde auf einen ungewöhnlichen Phänotyp hingewiesen, der mit einer schmerzhaften Hypertrophie der Wadenmuskulatur sowie einer Mutation des vermutlich extrazellulär gelegenen Anteils von Dysferlin-Protein einhergeht³.

Tab. 1.1: Klassifikation der Gliedergürteldystrophien (adaptiert nach Spuler, S. und v. Moers, A. 2004)

Benennung	Vererbung	Gen-Ort	Gen	Genprodukt
LGMD1A	Autosomal dominant	5q31	MYOT	Myotilin
LGMD1B		1q11-q21	LMNA	Lamin A/C
LGMD1C		3p25	CAV3	Caveolin-3
LGMD1D		6q23	???	???
LGMD1E		7q	???	???
LGMD2A	Autosomal rezessiv	15q15.1	CAPN3	Calpain 3
LGMD2B		2p13	DYSF	Dysferlin
LGMD2C		13q12	SGCG	γ -Sarcoglycan
LGMD2D		17q12-	SGCA	α -Sarcoglycan
LGMD2E		q21.33		
LGMD2F		4q12	SGCB	β -Sarcoglycan
LGMD2G		5q33-q34	SGCD	δ -Sarcoglycan
LGMD2H		17q12	TCAP	Telethonin
LGMD2I		9q31-q34	TRIM32	E3-ubiquitin ligase
LGMD2J		19q13.3	FKRP	Fukutin related protein
LGMD2K		2q31	TTN	Titin
		9q34.1	POMT1	Protein-o-mannosyltransferase

Die gewöhnlich mit einer deutlichen Erhöhung der Serum-Creatin-Kinase einhergehende Muskelschwäche in Patienten mit LGMD2B beginnt um das 20. Lebensjahr zuerst in den Muskeln des Beckengürtels. Unter langsamer Progression der Paresen kommt es später zu einer Beteiligung der distalen Muskulatur der unteren Extremität sowie des proximalen Schultergürtels. Während eine Beteiligung des Herzmuskels nicht bekannt ist, führt die Erkrankung aber regelmäßig zum Verlust der Gehfähigkeit, spätestens um das 50. Lebensjahr^{8,9}.

Bisher ist diese Erkrankung nur unzureichend behandelbar, ebenso existieren keine allgemeingültigen symptomatischen Therapiekonzepte, um den Verlauf abzumildern. Grundsätzlich existieren mehrere Ansätze zur kausalen Therapie von Muskelerkrankungen wie der Gliedergürteldystrophie: die Zelltherapie soll den symptomatischen Ersatz funktionsloser oder fehlender Muskelfasern ermöglichen, die Gen- bzw. Transkriptionsreparatur soll DNA bzw. mRNA in ihrer Funktion ersetzen, und die selektive Genregulation soll durch Beeinflussung von Regulatoren der Myogenese einen Therapieerfolg erzielen⁹. Als weiterer potentieller Therapieansatz ist die Immunmodulation bzw. im engeren Sinne die Regulation des Komplementsystems zu nennen, dessen Beteiligung an der Pathologie von Gliedergürteldystrophien erst in letzter Zeit deutlich wurde¹⁰.

1.2 Histologische Veränderungen bei Muskeldystrophien

Als histologische Veränderungen, die im Rahmen von Muskeldystrophien vorkommen, werden regelhaft beobachtet die Zentralisation der Nuclei, das Aufspalten (Splitting) von Muskelfasern in kleinere Einheiten, das Auftreten von Zellnekrosen und entzündlichen Infiltraten, das gehäufte Auftreten von regenerierenden Muskelfasern sowie die zunehmende Variabilität des Faserdurchmessers.

In der normalen, reifen Muskelfaser sind die Nuclei an der Peripherie der Muskelfaser subsarcolemmal angeordnet. Eine Wanderung der Kerne nach zentral stellt hier eine pathologische, wenn auch unspezifische, Reaktion dar. Diese findet sich besonders häufig im Rahmen einer muskulären Dystrophie¹¹.

Wenn zwei Muskelfasern sich in großer Nähe zueinander befinden und dabei einen Raum einnehmen, den normalerweise nur eine Faser besetzt, kann man davon ausgehen, dass sich die Muskelfaser hier gespalten hat¹¹. Dieses Fasersplitting ist eine häufige Veränderung in primären Muskelerkrankungen und tritt besonders oft bei Dystrophien auf. Im Muskelquerschnitt zeigt sich das Fasersplitting dadurch, dass sich besonders nahe benachbarte Fasern innerhalb derselben endomysialen Einscheidung befinden, was dem Bild von ineinander passenden Puzzleteilen sehr ähnlich ist¹¹.

Nekrosen stellen eine stereotype Antwort des Muskels auf verschiedenartige pathologische Stimuli dar. Sie entstehen durch Verletzungen aller Zellorganellen, eines Segments oder einer umschriebenen Region der Muskelfaser. In einer nekrotischen Faser erscheint der

kontraktile Apparat amorph und der striäre Charakter geht verloren. Das Sarkolemma ist unterbrochen und verschwindet, der Faserinhalt wird in der Regel von Phagozyten abgebaut¹¹. In der Gomori Trichrome-Färbung erscheint die nekrotische Zone blass grau oder grün-blau, während sich die normale Muskelfaser tief blau oder grün färbt¹¹.

Nekrosezonen werden nicht obligat von Makrophagen infiltriert. Die Histozyten wandern in das Zytoplasma ein, während die Zellkerne pyknotisch werden und das Sarkolemma verschwindet¹¹. Dabei ist Komplementaktivierung ein unweigerlicher Begleitumstand der Muskelfasernekrose¹². Die Komplementproteine treten durch die beschädigte Zellmembran und binden an intrazelluläre Organellen. Dann folgt die Bildung des Membran-Attack-Komplexes C5b-9, welches die membranösen Organellen lysiert. Komplementaktivierung ist außerdem assoziiert mit Faktoren, die die Makrophagen chemotaktisch anziehen und immobilisieren sowie das Sarkolemma für die Makrophagen opsonieren¹¹.

Die exzellente Regenerationsfähigkeit von Muskelgewebe ist unbestritten. Sie hängt im gestreiften Muskel vom Ausmaß der Nekrose, dem Zurückbleiben der Innervation, der Blutversorgung des betreffenden Gebietes sowie dem Restbestand der Muskelarchitektur ab. Morphologisch zeigt sich die Regeneration typischerweise in einem basophilen Zytoplasma sowie großen, dunklen, prominenten Nucleoli in den ebenfalls vergrößerten Zellkernen¹¹.

Ein gesunder Muskel weist eine regelmäßige und symmetrische Zellarchitektur auf, die durch auffallend konstante Durchmesser der einzelnen Muskelfasern verursacht ist. Im normalen Muskel überschreitet der größte den kleinsten Faserdurchmesser nicht um mehr als 12 %¹³. Strukturelle und funktionelle Beeinträchtigungen des Muskels erhöhen hingegen die Varianz des Durchmessers in einem histologischen Präparat.

1.3 Molekulare Grundlagen von Dysferlinopathien

Ein Modell der molekularen Grundlagen gängiger Muskeldystrophien bildet der so genannte Dystrophin-Glykoprotein-Komplex, der durch Defizienz einzelner seiner Proteine zu den spezifischen Krankheitsbildern der Muskeldystrophien vom Typ Becker, Typ Duchenne sowie der LGMD2-Typen C bis F führen¹⁴.

Im Falle der Typ B Gliedergürteldystrophie kommt es zu einer Defizienz des Dysferlin-Proteins, welches allerdings nicht mit dem Dystrophin-Glykoprotein-Komplex assoziiert ist, sondern sich an der Peripherie der Muskelfaser befindet. Das teilweise oder vollständige Fehlen von Dysferlin bei LGMD2B ist vermutlich auf Störungen der Proteinfaltung sowie

beschleunigtem Proteinabbau zurückzuführen⁴.

Welche Funktionen Dysferlin im einzelnen zugeschrieben werden können, ist derzeit unklar. Bisher gibt es Hinweise, dass es bei Reparaturvorgängen in der Zellmembran mitwirkt: Schädigungen des Sarkolemmas durch Mikroverletzungen haben normalerweise eine Akkumulation von Dysferlin am Schädigungsort zur Folge^{15,16}; im Falle des Fehlens von Dysferlin-Protein kommt es hingegen zu einer Persistenz der Membranschädigung trotz Anreicherung von Vesikeln an der Zellmembran, wofür die fehlende Interaktion zwischen Dysferlin und Annexin A1 und A2 verantwortlich gemacht wird¹⁷. Das 230 kDa schwere Dysferlin ist vermutlich überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert, da die Gen-Sequenzierung nur eine kurze transmembranöse Aminosäuresequenz mit einem kleinen, extrazellulären C-terminalen Ende sowie sechs intrazelluläre C2-Domänen zeigt, die auch in die intrazelluläre Calcium-Regulation involviert sind¹⁸.

1.4 Grundlagen der Muskelregeneration und Myogenese

Eine aktuelle Theorie über die Pathogenese von LGMD2B geht davon aus, dass bei Dysferlin-Defizienz die Reparatur einer Zellmembran, welche durch physiologische Vorgänge geschädigt wurde, behindert ist^{16,19}. Als wahrscheinliche Folge geht die Muskelfaser daran mittelfristig zugrunde und würde dann in einer lokalisierten Entzündungsreaktion durch Gewebsmakrophagen abgebaut, um durch eine neue Faser ersetzt zu werden.

Dieser Erneuerungsvorgang des Muskels wird gespeist aus sogenannten Satellitenzellen, die zwischen Basalmembran und Sarkolemma reifer Muskelfasern liegen²⁰. Satellitenzellen stellen ruhende Vorläuferzellen von Myoblasten dar und können z.B. durch Verletzung des Muskels aktiviert werden. Sie differenzieren sich dann zu proliferierenden Myoblasten, welche schließlich zu reifen, funktionalen Muskelfasern werden²¹. Satellitenzellen lassen sich durch enzymatische Dissoziation von Skelettmuskulatur und Kultivierung in wachstumsförderndem Medium aktivieren und als Myoblasten in Zellkultur propagieren²⁰.

Das Intermediärfilament Desmin wird von proliferierenden Myoblasten exprimiert^{22,23} und ist vorherrschend in reifen Myozyten²⁴. Die Hochregulation von Desmin ist ein Signal für die Differenzierung von Myoblasten. CD56, auch NCAM oder Antigen Leu-19, wird konstitutionell in proliferierenden Myoblasten exprimiert^{25,26} und ist nicht nachweisbar in reifem Muskel²⁷. Andere Zellen exprimieren ebenfalls CD56, darunter Lymphozyten, nicht jedoch Fibroblasten. Desmin und CD56 gelten als zuverlässige Myoblasten-Marker für Zellkulturen aus

Skelettmuskel. Die Aktivität der Creatin-Kinase, die die Energie für die Muskelkontraktion über ATP bereitstellt, stellt einen etablierten Marker für die Differenzierung von Myoblasten dar und korreliert mit der Fusion von Myoblasten²⁸.

Bei der enzymatischen Dissoziation vom biopsierten Muskelgewebe werden auch nicht-myogene Zellen ausgelöst. Der Hauptzelltyp, welcher dann mit Myoblasten zusammen in der Kultur propagiert wird, sind Fibroblasten, welche potentiell die Kultur dominieren können²⁰. An fibroblastischen Stromazellen des Knochenmarks²⁹ sowie des Thymus³⁰ bindet der monoklonale Antikörper TE7, welcher als Fibroblastenmarker auch für Myoblastenkulturen charakterisiert wurde³¹.

Die Differenzierung von Myoblasten geht einher mit dem Verlust der Fähigkeit zur Proliferation³², was bei serieller Propagation zur Überwucherung der Kultur mit Fibroblasten führen kann. Induziert wird die Differenzierung durch Reduktion der Serumkonzentration und anderen Mitogenen im Kulturmedium²⁰. Daneben differenzieren sich einige Zellen unabhängig hiervon spontan zu Myotuben, besonders bei hoher Zelldichte³¹.

1.5 Komplement-vermittelte Pathologie der Dysferlinopathien

Prinzipiell könnten Therapien bei allen primären Muskelerkrankungen auf verschiedenen Ebenen ansetzen: vor bzw. zum Zeitpunkt der Zellschädigung oder während der spontanen Muskelregeneration.

Trotz erster Erfolge bei Therapiestudien primärer Muskelerkrankungen mit Muskelvorläuferzellen zeigte sich, dass sowohl autologe als auch allogene Myoblasten eine Entzündungsreaktion im Wirtsmuskel auslösen, die einen großen Teil dieser Zellen zerstört³³⁻³⁵. Wenngleich die Beteiligung von Natural-Killer-(NK)-Zellen nahe gelegt wurde³⁶, ist unklar wodurch die Myoblasten im einzelnen geschädigt werden.

Als weitere Ursache für den Zelltod von injizierten Myoblasten kommt das Komplement-System in betracht. Dieses ist neben seiner Rolle in der Pathologie der Muskelnekrosen bei Muskeldystrophien und -entzündungen¹² sowie der Myasthenia gravis^{37,38} maßgeblich bei der Dermatomyositis beteiligt^{39,40}. Dabei greifen distinkte Faktoren des Komplementsystems in die Pathologie ganz unterschiedlicher Krankheitsursachen ein: so ist der membranolytische Komplement-Komplex (Membrane Attack Complex) als Endprodukt der Komplementaktivierung sowohl bei nekrotisierenden Muskelerkrankungen⁴¹ als auch bei Erkrankungen ohne Muskefasernekrosen auf der Zellmembran nachweisbar⁴².

Befunde an gesunden Muskelzellen weisen auf eine differentielle Wirkung von Komplement je nach Zelltyp hin: während gesunde Myoblasten gegenüber Komplement als unempfindlich beschrieben werden, zeigte sich eine deutliche Schädigung von gesunden Myotuben unter Komplementattacke⁴³. Als ursächlich hierfür wurde das Fehlen der membranständigen Komplement-Inhibitoren auf Myotuben angesehen, die auf Myoblasten vorhanden sind, da bei Antagonisierung der Inhibitoren das Komplement-System auch an Myoblasten spontan aktiviert wurde⁴³.

Auch bei LGMD2B-Patienten wurde eine konsistente Beteiligung des Komplementsystems gefunden. Histologisch zeigten sich neben perivaskulären Infiltraten⁴⁴ und zellulären Gewebsinfiltraten^{44,45} Ablagerungen des Komplement-komplexes Membrane Attack Complex (MAC) an nekrotischen Muskelfasern^{15,45}.

1.6 Regulation der komplement-vermittelten Zellschädigung

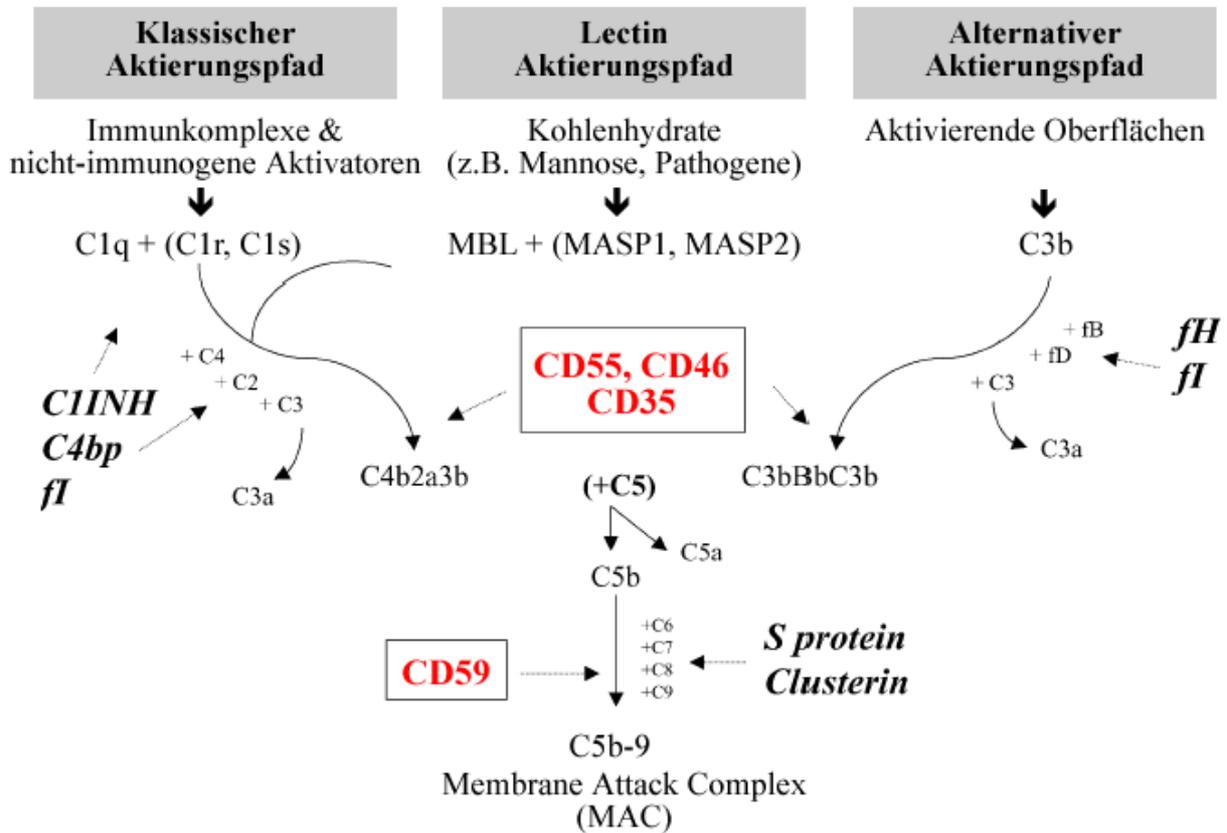
Die Komplement-Entzündungs-Kaskade ist ein phylogenetisch alter Teil des angeborenen Immunsystems. Das Komplementsystem hat drei fundamentale physiologische Bedeutungen: Abwehr gegenüber mikrobiellen Infektionen, Vermittlung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem via B-Zell-Rezeptoren sowie Beseitigen der Immunkomplexe und der Endprodukte der Entzündungsreaktion zur Sicherstellung des Heilungsprozesses.

Im Rahmen der Erregerabwehr erzeugt das Komplementsystem den membranolytischen Komplex C5b9 (Synonym: Membrane Attack Complex, MAC) auf der Oberfläche des Pathogens sowie der C-Fragmente (Synonym: Opsonine, z.B. C1q, C3b, iC3b), die mit C-Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren (CR1, CR3, CR4), um die Phagozytose durch Makrophagen zu fördern. Die Aktivierung der Komplementkaskade erfolgt durch drei unterschiedliche Pfade, wobei zuletzt alle in einen gemeinsamen Pfad einmünden, an dessen Ende die Formation des MAC steht, welcher die Phospholipid-Doppelschicht der Zielzelle durchdringt und einen Porus in ihr verursacht, wodurch die Zelle lysiert wird⁴⁶.

Da das Komplementsystem jedoch bei inadäquater Aktivierung ebenso effektiv gegen gesunde körpereigene Zellen vorgeht⁴⁷, existieren eine Reihe negativ regulatorischer Moleküle, die entweder die Funktion der C3-Spaltungsenzyme oder die Formierung des MAC inhibieren⁴⁸. Lösliche Komplement-Inhibitoren sind C1 inhibitor, C4b-Bindungs-Protein, Faktor H, Faktor I, S-Protein und Clusterin. Die anderen Inhibitoren werden auf

Zelloberflächen exprimiert und beinhalten Membran-Kofaktor-Protein (MCP, CD46), Decay Accelerating Faktor (DAF, CD55), Komplementrezeptor 1 (CR1, CD35), Homologer Restriktionsfaktor und Homologer Restriktionsfaktor 20 (CD59)⁴⁹.

Die regulatorischen Mechanismen des Komplementsystems sind fein ausbalanciert, damit einerseits Komplement fokussiert auf der Oberfläche von Pathogenen deponiert wird, während andererseits die Ablagerung auf gesunden, körpereigenen Zellen verhindert wird (s. Abb. 1.6).



Rot: membranständige Komplement-Inhibitoren

Kursiv: lösliche Komplement-Inhibitoren

Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Inhibitoren der Komplementkaskade (adaptiert nach Gasque, P. 2004)

Zentrale Stellung bei der Inhibition aller drei Aktivierungspfade der Komplementkaskade nehmen die membranständigen Komplementinhibitoren CD55, CD46 und CD35 und CD59 (rot) ein. Neben den löslichen Komplementinhibitoren (kursiv) verursachen sie an unterschiedlichen Stellen der Kaskade letztlich die Bildung des zytolytischen Membrane Attack Komplexes (MAC).

Während CD46, CD55 und CD35 in den frühen Phasen der Kaskade inhibitorisch wirken, wirkt CD59 im terminalen, lytischen Stadium, das durch Bildung des MAC vermittelt wird. CD35 besitzt sowohl decay accelerating- als auch Kofaktor-Aktivität und inhibiert somit sowohl die klassische als auch die alternative Aktivierung der Kaskade. CD55 und CD46 inhibieren vornehmlich einen einzelnen Pfad, wobei CD55 den Zerfall der C3/C5 Convertase direkt beschleunigt und so hauptsächlich die klassische Aktivierung hemmt, während CD46 eine Kofaktor-Aktivität für die Inaktivierung von C3b aufweist und so hauptsächlich den

alternativen Pfad inhibiert⁵⁰.

Die Regulation der Komplement-Inhibitoren selbst wiederum involviert eine Reihe von Faktoren, die gewebsspezifisch zu unterschiedlichen Effekten führen: so verursacht TGF- β in Keratinozyten eine Hochregulation von CD46 und CD59, während die CD55-Expression unbeeinflusst bleibt⁵¹. In orbitalen Fibroblasten hingegen kommt es umgekehrt durch TGF- β zur Hochregulation von CD55, nicht jedoch von CD46 und CD59⁵². Letztere Effekte verursachen ganz analog auch TNF- α und IFN- γ in Endothelzellen^{53,54}. Schließlich kommt es auch durch den Einfluss von Vascular Endothelial Growth Factor^{55,56} und Basic Fibroblast Growth Factor⁵⁵ zur Induktion von CD55.

Kürzlich wurde auch die Beteiligung der Komplement-Regulation an der Pathologie von LGMD2B-Patienten deutlich. Die Dysferlin-defizienten Patienten wiesen auf mRNA- wie auch auf Protein-Ebene verminderte Spiegel des Komplement-Inhibitors CD55 auf¹⁰. Damit einhergehend kommt es zu einer Verminderung der Konzentration von SMAD-Proteinen. Da der Promotor der CD55-Transskription eine Bindungsstelle für SMAD aufweist, wird derzeit eine besondere Verbindung zwischen CD55 und SMAD vermutet: durch die Verminderung der SMAD-Proteine, die normalerweise in einem Proteinkomplex in den Zellkern übertreten, könnte die Transskription von CD55 verhindert werden, was die defiziente CD55-Expression erklären würde. Unterstützt wird diese Theorie durch die differentielle Expression von SMAD-Proteinen in Muskel und Herz von LGMD2B-Patienten bzw. SJL/J-Mäusen: im Skelettmuskel tritt SMAD vermindert, im Herz in normalen Konzentrationen auf. Dies spiegelt die klinische Situation bei LGMD2B-Patienten wider, die keine kardiale Muskelschwäche aufweisen¹⁰.

Bislang sind die Mechanismen der Komplement-Regulation im Muskel jedoch wenig untersucht. Im Falle einer ursächlichen Beteiligung des Komplement-Systems an der Pathologie von Gliedergürteldystrophien wäre allerdings eine lokale oder systemische Beeinflussung der Komplementkaskade ein viel versprechender therapeutischer Weg, da heute eine Reihe effektiver pharmakologischer Mittel zur Verfügung steht, um das Komplement-System auszubremsen.

1.7 Modelle zur Erforschung von Dysferlinopathien

Die Erforschung der Pathologie von Gliedergürteldystrophien erfolgt derzeit fast ausschließlich *in vitro*. Sie beinhaltet sowohl tierexperimentelle Modelle⁵⁷ wie auch die Nutzung humaner Zellkulturen, während klinische Befunde durch kausale Therapie von

Gliedergürteldystrophien anders als für andere Muskeldystrophien⁵⁸ nur anhand von Einzelfällen durch off-label use von Medikamenten im Rahmen individueller Heilversuche beschrieben sind.

1.7.1 Humane Zellkulturen in Forschung und Therapie

Muskelvorläuferzellen sind relativ einfach aus Biopsiematerial zu gewinnen und in Kultur zu expandieren. Aufgrund von Ergebnissen aus mehreren präklinischen und klinischen Studien zum therapeutischen Effekt bei Applikation autologer humaner Skelettmuskelzellen bei Residualzustand nach Herzinfarkt wird beispielsweise geschätzt, dass etwa 10^9 Zellen verpflanzt werden müssen, um eine effektive Therapie einzuleiten³¹. Es wird davon ausgegangen, dass Muskelvorläuferzellen *in vitro* vermehrt werden müssen, da die Menge geeigneter Zellen aus Biopsiematerial begrenzt ist.

Hinsichtlich einer Gentherapie primärer Muskelerkrankungen lässt sich das interessierende Gen mit hoher Effizienz *ex vivo* in Muskelvorläuferzellen inkorporieren⁵⁹⁻⁶¹. Nach mehrfachen Injektionen der Zellen in den vitalen Muskel fusionieren die transformierten Zellen mit den Skelettmuskeln⁶² und exprimieren das gewünschte Genprodukt⁶³⁻⁶⁵.

Die Bedeutung dieser Befunde für den klinischen Therapieeffekt ist derzeit noch gering – im Falle der Herzinfarktbehandlung beispielsweise blieb die Myoblasteninjektion in der Phase-3-Studie („MAGIC“) nach bisherigen Ergebnissen ohne oder sogar mit negativem Behandlungseffekt gegenüber Placebo⁶⁶.

1.7.2 Tierexperimentelle Modelle der Dysferlin-defizienten Muskeldystrophie

Es existieren drei Mausmodelle der Dysferlin-defizienten Muskeldystrophie, welche die Stämme der SJL/J-Maus, der A/J-Maus sowie der Dysferlin-knockout Maus umfassen^{67,68}. In letzterem Stamm wurde die C2E Domäne durch ein Neomycin-Gen ersetzt, während in der A/J-Maus eine ETn Retrotransposon-Insertion im Intron 4 besteht. Die SJL/J-Maus weist hingegen eine Splice-Mutation im Exon 45 des Dysferlin-Gens auf. Alle drei Mausmodelle zeigen histopathologisch neben dystrophischen auch diskrete entzündliche Zeichen, welche ebenso bei LGMD2B-Patienten zu finden sind.

Der SJL/J-Mausstamm wird seit längerem als Modell für Autoimmunerkrankungen genutzt, so z.B. als Modell für die Multiple Sklerose (experimentelle allergische Encephalomyelitis)⁶⁹. Durch experimentelle genetische Modifikationen durch eine 12 kb Deletion am 3' Ende des

DYSF-Gen wurde eine komplette Auslöschung der Dysferlin-Expression erreicht¹⁶. Bei der SJL/J-Maus kommt es spontan zu einer Myopathie, deren Histologie ein dystrophisches Muster aufweist, das dem von LGMD2B-Patienten sehr ähnlich ist⁴⁵. Obwohl die Myopathie von einer Hochregulation der MHC Klasse I - Moleküle begleitet wird, ist sie von dieser unabhängig, da sich die Myopathie auch unter MHC Klasse I - knock-out entwickelte⁷⁰. Während also normalerweise die MHC-Hochregulation als Marker inflammatorischer Myopathien gilt⁷¹, ist die Entwicklung der LGMD2B-Myopathie offenbar unabhängig von zellvermittelter Zytotoxizität und beruht vermutlich auf der komplement-vermittelten Zellschädigung.

Histopathologisch zeigen sich im SJL/J-Mausmodell deutliche dystrophische Zeichen beginnend zwischen der 22. und 26. Lebenswoche⁴, am deutlichsten als steiler Anstieg der Zahl von Muskelfasernekrosen (s. Abbildung 1.7). In einer neueren Studie konnte neben der Beteiligung des Skelettmuskels auch eine Beeinträchtigung der Herzmuskulatur gezeigt werden: während die Routinehistologie und sogar die Elektronenmikroskopie von SJL/J-Tieren im Alter von 32 bis 34 Wochen unauffällige Verhältnisse des Herzmuskels ergaben, zeigte sich funktionell eine deutlich erhöhte Anfälligkeit gegenüber chemisch-toxischer Stressbelastung als bei Normalkontrollen⁷². Hiermit einher geht eine verringerte Genexpression von Strukturproteinen sowie eine veränderte Expression von Proteinen, die im Zusammenhang mit Fibrose und Herzmuskelschädigung stehen⁷².

Der klinische Ausprägungsgrad der Erkrankung jedoch, welcher gewöhnlich für Labortiere mithilfe des SHIRPA-Protokolls⁷³ bestimmt wird, konnte bisher für die Myopathie bei SJL/J-Mäusen nicht zufrieden stellend gemessen werden, da die Abstufungen der motorischen Leistungsfähigkeit intra- und interindividuell zu stark variierte (Daten aus der Dissertation von Vieweger, A. an der Klinik für Neurologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin).

Entwicklung der Muskelfasernekrosen bei der SJL/J Maus

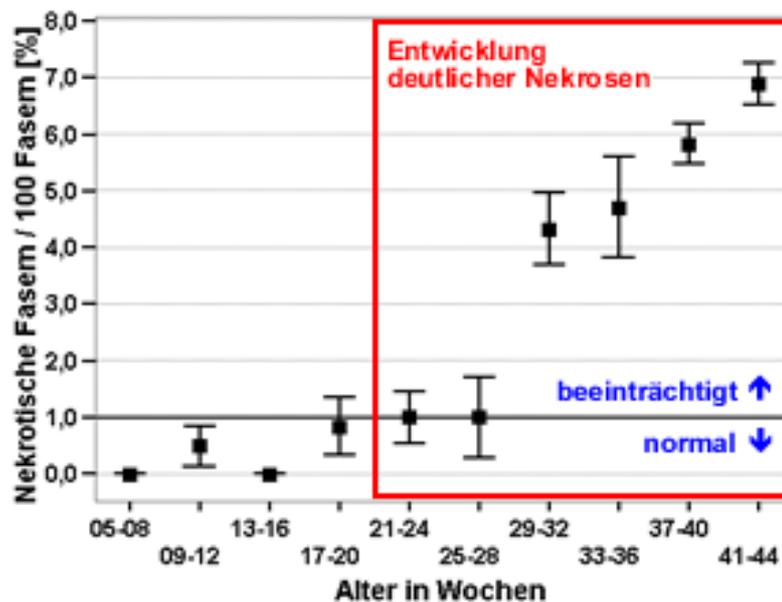


Abb. 1.7: Zeitliche Dynamik und Ausprägung der Muskelfasernekrosen im Mausmodell

Die Ausprägung von Muskelzellnekrosen im Mausmodell ist altersabhängig. Die relative Anzahl nekrotischer Fasern zeigt in Abhängigkeit vom Alter der Tiere einen sprunghaften Anstieg der Nekrosen ab etwa 24 Wochen (rot umrandet). Infolgedessen lässt sich unterhalb einer Schwelle von 1% nekrotischer Fasern im histologischen Präparat der Muskel als „normal“ und oberhalb als „beeinträchtigt“ definieren, da sich die deutliche Beschleunigung der Ausprägung von Nekrosen von diesem Basiswert aus entwickelt.

1.8 Rationale

Unter der Hypothese, dass Komplement in Patienten mit Gliedergürteldystrophie eine schädigende Wirkung entweder auf Muskelvorläuferzellen oder auf reife Muskelzellen ausübt, wurde in der vorliegenden Studie zunächst in der humanen Zellkultur die toxische Komplement-Wirkung auf die einzelnen Zelltypen von Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen verifiziert.

Es wurde angenommen, dass die hierunter erwartete höhere Komplement-Empfindlichkeit von Dysferlin-defizienten Zellen ähnlich wie bei gesunden Myotuben durch ein konstitutives Fehlen membranständiger Komplement-Inhibitoren bei LGMD-Patienten verursacht würde. Deshalb wurden anschließend zur Identifikation des Mechanismus der

Komplementschädigung auf dysferlin-defizienten Zellen die Komplement-Inhibitoren CD55 und CD59 pharmakologisch ausgeschaltet, um hierdurch einen verstärkten toxischen Effekt unter Komplementattacke nachzuweisen.

Zuletzt wurde die Übertragbarkeit des projizierten Pathogenese-Modells von *in vitro*- auf *in vivo*-Bedingungen getestet: Im Mausmodell der Dysferlin-defizienten Gliedergürteldystrophie wurde durch spezifische Inhibition des Komplement-Faktors C5 versucht, das Fortschreiten dystrophischer Veränderungen in der Muskelhistologie zu verhindern.

2 Material und Methoden

2.1 Experimente in der Zellkultur

2.1.1 Patienten und Dysferlin-Mutationen

Die in den Versuchen verwendeten Muskelzellen wurden aus Biopsien von zwei Muskelgesunden sowie drei LGMD2B-Patienten gewonnen, die in der Sprechstunde der Muskelambulanz der Charité, Universitätsmedizin Berlin, diagnostiziert wurden. Als muskelgesund wurden die Patientin (23 Jahre) K.S. sowie der Patient C.N. (19 Jahre) diagnostiziert. Die LGMD2B-Patienten weisen je unterschiedliche Dysferlin-Mutationen auf, die sich auf Ebene der Exone, der mRNA sowie der exprimierten Proteine unterscheiden⁴. Tabelle 2.1.1 gibt eine Übersicht über die Mutationsorte und deren Folgen auf RNA- und Proteinebene.

Aus der Familie A weist der aus dem Libanon stammende 50-jährige Patient S.A. eine homozygote Missense-Mutation in Exon 38 auf. Er berichtete eine seit dem 24. Lebensjahr langsam progrediente Verminderung der Muskelkraft, zunächst in der Beckengürtel- und proximalen Oberschenkelmuskulatur, dann in den Oberarmen. Einige Jahre später war eine Verschmächtigung der proximalen Extremitätenmuskulatur hinzugetreten. Die Krankheit verlief langsam progredient, so dass mit 47 Jahren eine weitreichende Einschränkung der Gehfähigkeit eintrat. Zum Zeitpunkt der molekulargenetischen Diagnosestellung bewältigte er mit Unterstützung eine Gehstrecke von 50 m. Klinisch wies er dabei eine Beckengürtelbetonte symmetrische Gliedergürtelparese mit Aussparung der Gesichts- und Halsmuskulatur auf. Mutter und Onkel des Patienten litten an progressiver Muskelschwäche,

die im Erwachsenenalter begann, während vier seiner Cousins bereits mit 15 Jahren ebenfalls eine ähnliche Muskelschwäche entwickelten.

Tab. 2.1.1: Übersicht über die Dysferlin-Mutationen der verwendeten Muskelvorläuferzellen (adaptiert nach Wenzel et al., 2006)

Familie	Patient	Mutation in Exon	Merkmalsform	Veränderung auf der Ebene von			Art der Mutation
				Nukleotid	mRNA	Protein	
A	S.A.	38	homozygot	c.4022T>C	r.4022u>c	p.L1341P	Missense
B	A.L.	8	heterozygot	c.855+1delG	decay	p.G299R	Missense
		9	heterozygot	c.895G>A	r.895g>a		
C	A.O.	16	heterozygot	c.1448C>A	r.1448c>a	p.S483X	Nonsense
		55	heterozygot	c.*107T>A	r.*107u>a		

Die 47-jährige Patientin A. L. aus der Familie B weist eine heterozygote Missense-Mutation in Exon 8 und 9 auf. Sie bemerkte seit dem 26. Lebensjahr Schwierigkeiten beim Joggen und wurde in der Folge auf degenerative Arthritis behandelt und mehrfach operiert, bis sie mit LGMD2B diagnostiziert wurde. Zu diesem Zeitpunkt wies sie einen watschelnden Gang und eine deutliche Schwäche des Beckengürtels ohne Anzeichen für distale oder Schultergürtelbeteiligung sowie Atrophien auf. Während der Bruder der Patientin im 39. Lebensjahr ebenfalls mit LGMD2B diagnostiziert wurde, zeigten die Mutter und eine Schwester sowie zwei weitere Familienmitglieder trotz heterozygoter Dysferlin-Mutation keine klinische Symptomatik auf.

Die 36-jährige, aus Nigeria stammende, Patientin A.O. weist eine heterozygote Nonesense-Mutation in Exon 16 und 55 auf. Sie stellte sich mit seit etwa vier Jahren bestehender, progredienter Schwäche des Gliedergürtels mit Betonung der ischiocruralen Muskulatur vor, die zur Beeinträchtigung beim Treppensteigen führte. Da die Patientin zusätzlich eine progrediente Schwäche der distalen Muskulatur mit Betonung der unteren Extremität aufweist, besteht eine Mischform aus der typischen proximalen Manifestation der LGMD2B sowie der für die Miyoshi-Myopathie typischen distalen Muskelschwäche. Die Eltern sowie

alle vier Brüder und drei Schwestern der Patientin sind klinisch unauffällig.

2.1.2 Chemikalien

<i>Zellkultur</i>		
Einfrier- medium	<u>Enthält:</u>	
	DMEM - 70 Vol. %	
	FCS - 20 Vol. %	
	DMSO - 10 Vol. %	
	DMEM	D-Minimal Essential Medium, Fa. Invitrogen (Karlsruhe), Gibco D-MEM + 4500 mg / l Glucose + L-Glutamine – Pyruvate, Kat.Nr. REF 41965-039
	FCS	Fetal Calf Serum, Fa. PAA (Pasching), Kat. Nr. A15-043
	DMSO	Dimethylsulphoxid, Fa. Sigma-Aldrich (München), Kat.Nr. D2650
Fusions- medium	<u>Enthält:</u>	
	DMEM - 98 Vol. %	
	Pferdeserum - 2 Vol. %	
	Pferdeserum	Horse Serum, Fa. PAA (Pasching), Kat.Nr. B15-021
PBS	Physiological Buffer Solution, Fa. Invitrogen (Karlsruhe), Gibco D-PBS + CaCl ₂ + MgCl ₂ , Kat.Nr. REF 14040-091	

Skeletal Muscle Growth Medium (SMG- Medium)	<u>Enthält:</u>	
	PromoCell Growth Medium	- 1 Einheit
	FCS, zusätzlich	- 5 Vol.% (gesamt: 10 Vol.%)
	Glutamax	- 0,015 %
	Gentamicin	- 40 µg / ml
	PromoCell Growth Medium	PromoCell Skeletal Muscle Cell Growth Medium + SMG Supplement Pack, Fa. PromoCell (Heidelberg), Kat.Nr. C-23060 bzw. C-39360
		<u>Enthält:</u>
		FCS - 0,05 ml/ml
		bovines Fetuin - 50,0 µg/ml
		Humaner epidermaler Wachstumsfaktor (rekombinant) - 0,01 µg/ml
		Humaner basaler Fibroblasten- wachstumsfaktor (rekombinant) - 0,001 µg/ml
		Humanes Insulin - 10,0 µg / ml
		(rekombinant) Dexamethason - 0,40 µg / ml
		Gentamicinsulfat - 50,0 µg / ml
		Amphotericin B - 0,05 µg / ml
		Phenolrot - 0,62 ng / ml
	Gentamicin	Gentamicin, 50 mg / ml, Fa. Invitrogen (Karlsruhe), Kat.Nr. 15750-037
	Glutamax	Glutamax, Fa. Invitrogen (Karlsruhe), Kat.Nr. 35050-038
Trypsin	Trypsin-EDTA, Fa. Invitrogen (Karlsruhe), Gibco Kat.Nr. 25300-054	

Waschmedium	<u>Enthält:</u> DMEM	
Waschmedium	FCS	- 10 Vol.%
	Gentamicin	- 40 µg / ml
Komplement-Assay		
Antikörper CD 55	Monoclonal Antibody to Human CD 55, Fa. Acris Antibodies (Hiddenhausen), Kat.Nr. SM1141PS	
Antikörper CD 59	Mouse Anti Human CD 59 (MCA1054), Fa. Serotec (Oxford)	
Normalserum-Puffer	<u>Enthält:</u> Serum einer gesunden Freiwilligen aus der Muskelambulanz Charité, eingefroren spätestens 1 Stunde nach Blutentnahme, Lagerung bei -25°C	
	NHS 1:5	5 Teile VAP/BSA-Puffer + 1 Teil Normalserum
	NHS 1:10	10 Teile VAP/BSA-Puffer + 1 Teil Normalserum
	NHS 1:20	20 Teile VAP/BSA-Puffer + 1 Teil Normalserum
Propidiumiodid-Lösung	<u>Enthält:</u> PBS Propidiumiodid - 0,5 µg / ml Fa. Sigma-Aldrich (München), Kat.Nr. P4170	
Trypanblau	Trypan Blue 0,4 % Stain, Fa. Sigma-Aldrich (München), Kat. Nr. T8154	
VAP/BSA-Puffer	<u>Enthält:</u> VAP - 99 Vol.% BSA - 1 Vol.%	
	VAP	Barbital-Acetat-Puffer Stammlösung A, Fa. Dr. K. Hollborn & Söhne (Leipzig), Kat.Nr. B01-0500A
	BSA	Fa. AppliChem (Darmstadt), Kat. Nr. A0849,0010

2.1.3 Material und Geräte

<i>Zellkultur</i>	
Brutschrank	Hera Cell, Fa. Heraeus (Hanau)
Einfrierröhrchen	CryoTube Vials, Fa. NUNC (Roskilde), Kat.Nr. 343958
Färbeschälchen	Falcon Easy Grip Tissue Culture Dish 35 x 10 mm, Fa. Becton Dickinson (Heidelberg), Kat.Nr. 353001
Flakons	BD Falcon Flask 75 cm ² , Fa. Becton Dickinson (Heidelberg), Kat.Nr. 353135
Kühlschrank	KF 380, Fa. Eureka (Mumbai)
Kühltruhe	Hera freeze, Fa. Heraeus (Hanau)
Mikroskop	Wilovert S, Fa. Hund (Wetzlar)
Mikrotiterplatte	Falcon Microtest 96, Fa. Becton Dickinson (Heidelberg), Kat.Nr. 353072
Pipetten	Falcon serological pipet, 5 ml – 10 ml – 25 ml, Fa. Becton Dickinson (Heidelberg), Kat.Nr. 357543
Pipettenspitzen	epT.I.P.S, 1000 µl – 200 µl – 20 µl, Fa. Eppendorf (Hamburg)
Pipettierer	Pipetus Junior, Fa. Hirschmann Laborgeräte (Heilbronn)
Sterilwerkbank	Hera Safe, Fa. Heraeus (Hanau)
Stickstofftank	Chronos, Fa. Messer (Sulzbach)
50 ml Röhrchen	Polypropylene Conical Tube, Fa. Becton Dickinson (Heidelberg), Kat.Nr. BD352070
Wasserbad	W 12, Fa. Medingen, Firmengruppe Preiss-Daimler (Dresden)
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, Fa. LO- Laboroptik (Friedrichsdorf)
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R, Fa. Heraeus (Hanau)
<i>Komplement-Assay</i>	
Fluoreszenz-licht	Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 100 W / DC, Fa. Osram (München) elektronisches Vorschaltgerät ebq 100 dc, Fa. Osram (München)

Kamera	CCD Kamera, Leica DC100, Fa. Leica (Bensheim)
Mikroskop	Inverses Lichtmikroskop, Leica DMIRB (inverted), Fa. Leica (Bensheim)
	Objektiv: N Plan, 10 x / 0.25, Fa. Leica (Bensheim)
Software	Betriebssystem Windows NT, Software Leica DC100 program, Fa. Leica (Bensheim)

Durchflusszytometrie

FACS-Tubes	Fa. BD, BD Falcon (Heidelberg), Kat. Nr. 352053
15 ml Röhrrchen	Blue Max Jr. Conical Tube, Fa. Becton Dickinson (Heidelberg), Kat.Nr. BD352096
Zytometer	FACScalibur, Fa. Becton Dickinson (Heidelberg)
Software	CellQuest, Fa. Becton Dickinson (Heidelberg)

2.1.4 Zellkultur

Aus Muskelbiopsien von Patienten der Muskelambulanz an der Charité, die analog zum Protokoll in Sektion 2.3.6 durch die Neurochirurgische Abteilung gewonnen wurden, waren zunächst Primärkulturen humaner Myozytenvorläuferzellen (Synonym: Satellitenzellen, Myoblasten) im Muscle Tissue Culture Collection Labor vom Muskelzentrum München am Friedrich-Bauer-Institut der Universität München hergestellt worden, welche in der Myoblasten-Bank des Muskeldystrophie-Netzwerkes (MD-NET, www.md-net.org) konserviert wurden. Myoblasten-Primärkulturen reflektieren viel stärker als konstruierte Zelllinien die wirkliche Myogenese. Allerdings besteht die Gefahr der Kontamination der Primärkultur mit nicht-myogenen Zellen. Aufgrund dessen wurden Satellitenzellen aus der Biopsie durch Trypsination dissoziiert, mit einem Antikörper gegen NCAM markiert und durchflusszytometrisch auf eine Reinheit von >99,5 % purifiziert⁷⁴.

2.1.4.1 *Auftauen von Myoblasten*

Zu Beginn wurde die Sterilwerkbank über mind. 15 Min. in Betrieb genommen und das SMG-Medium auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Dann wurden 10 ml SMG-Medium in einem 75 ml Flakon vorgelegt und das Einfrierröhrchen mit den entsprechenden Myoblasten aus dem Stickstofftank entnommen. Sofort nach Entnahme wurde das Einfrierröhrchen bei 37°C unter Schwenken so lange aufgetaut, dass das Zellpellet gerade dekantiert werden konnte. Dann

wurde das Zellpellet in den Flakon dekantiert und dieser solange geschwenkt, bis die Zellsuspension vollständig gelöst war. Zuletzt wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C sowie 5 % CO₂ inkubiert. Nach spätestens 24 Std. wurde das SMG-Medium gewechselt, um die toxischen Reste von DMSO aus der Kultur zu entfernen.

2.1.4.2 Medienwechsel

Ein Medienwechsel wurde alle 2-3 Tage (montags, mittwochs, freitags) vorgenommen. Dafür wurde zu Beginn die Sterilwerkbank über mind. 15 Min. in Betrieb genommen und das SMG-Medium sowie PBS auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Dann wurden die Zellen aus dem Brutschrank entnommen, das alte Medium aus dem Flakon abgesaugt und mit 8 ml PBS ersetzt. Nach Schwenken wurde PBS abgesaugt und mit 10 ml frischen SMG-Mediums ersetzt. Zuletzt wurde der Flakon wieder in den Brutschrank transferiert.

2.1.4.3 Expandieren der Kultur

Die Myoblasten wiesen abhängig vom zugrunde liegenden Krankheitsbild eine Teilungsfähigkeit von ca. 30 Passagen im Gesunden und ca. 20 Passagen im Dystrophiekranken auf, was eine Überlebenszeit der ursprünglichen Kultur von ca. 6 bzw. 4 Wochen bedeutet. Nach diesem Zeitpunkt war eine partielle Fusionierung zu Myotuben sowie ein massives Zellsterben zu verzeichnen. Damit sich nicht spontan Myotuben durch eine hohe Zelldichte in der Kultur bildeten, wurde die Kultur ab einer Konfluenz der Zellen von ca. 75 % geteilt. Zu diesem Zweck wurde die Zelldichte sowie die Zellkonstitution bei jedem Medienwechsel unter dem Mikroskop geprüft und bei einer Bedeckung von ca. 70% der Fläche des Flakons die Kultur gesplittet.

Dazu wurde analog zum Medienwechsel vorgegangen, wobei nach dem Waschen mit PBS 3 ml Trypsin zum Flakon gegeben wurde. Nach Schwenken wurde die Kultur für 3 - 5 Min. inkubiert, die Ablösung der Zellen im Mikroskop beurteilt und noch am Flakonboden haftende Zellen durch tangenciales Anstoßen des Flakons gelöst. Anschließend wurden 12 ml SMG-Medium hinzugefügt, um das Trypsin zu inaktivieren. Nach Schwenken wurden je 3,75 ml Zellsuspension in einen neuen Flakon, in dem zuvor 8 ml SMG-Medium vorgelegt worden war, transferiert, und die Kultur anschließend inkubiert.

2.1.4.4 Einfrieren von Myoblasten

Nach zwei- bis dreifacher Expansion der Zellkultur wurde ein Teil der Myoblasten bei ca.

70% Konfluenz der Zellen zur späteren Verwendung wieder eingefroren. Dazu wurde analog zu 2.1.3.3 mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Anschließend wurden je Flakon 12 ml Waschmedium (gekühlt auf 4°C) zugegeben, geschwenkt und die Zellsuspension in ein 50 ml Tube transferiert. Dieses wurde bei 4°C über 5 Min. bei 270 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet am Boden wurde nun mit 1 ml Einfriermedium je Flakon durch schnelles Auf- und Abpipettieren suspendiert. Dann wurde je 1 ml dieser Zellsuspension in ein Einfrierrohrchen gegeben, welches sofort auf Eis zwischengelagert und direkt im Anschluss in eine -80°C Kühltruhe transferiert wurde. Nach 24 Stunden wurde das Einfrierrohrchen in flüssigem Stickstoff eingelagert.

2.1.4.5 Differenzierung zu Myotuben

Nach ausreichender Expansion der Zellkultur wurden die Myoblasten zur Durchführung des Komplement-Assays zu Myotuben differenziert. Dazu wurden die Myoblasten bei einer Konfluenz von ca. 50 % analog zu 2.1.3.4 gewaschen, trypsinisiert und im Waschmedium zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes wurde dann das Zellpellet in 15 ml PBS (gekühlt auf 4°C) je Flakon suspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt, um das Waschmedium vollständig aus dem Zellpellet zu entfernen. Anschließend wurde das Zellpellet mit 3 ml Fusionsmedium (gekühlt auf 4°C) suspendiert und die Zahl der lebenden Zellen bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau durch Auf- und Abpipettieren vermischt und anschließend 20 µl der Mischung auf eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben. Auf wenigstens vier nicht angrenzenden Zählfeldern wurden dann die hell leuchtenden Zellen, welche durch ihre Membranintegrität den Farbstoff nicht aufnehmen, gezählt und die Konzentration von Zellen in der Zellsuspension ermittelt (Mittlere Zellzahl in dem von drei Linien begrenztem Areal $\times 2 \times 10^4 = \text{Zellzahl} / \text{ml}$). Anschließend wurden ca. 20000 Zellen in jeweils ein Loch (Fläche: 0,32 cm²) einer 96-Loch-Microtiterplatte transferiert und das Volumen je Loch mit Fusionsmedium (erwärmt auf 37°C) auf 200 µl aufgefüllt. Die Microtiterplatte wurde nun für zwei Tage inkubiert, dann nach Waschen mit PBS ein Medienwechsel mit Fusionsmedium vorgenommen. Am vierten Tag wurde die Differenzierung der Myotuben im Mikroskop anhand der Morphologie kontrolliert. Die Zahl lebender Myotuben wurde am vierten Tag der Differenzierung durch Zählen der Zellen nach Trypanblaufärbung in der Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl betrug durchschnittlich 14 % der Ausgangszellzahl je Loch.

2.1.5 Mikroskopische Untersuchung

2.1.5.1 *Komplement-Assay*

Je nach Versuchsanordnung wurde entweder nach oder vor der Differenzierung der Zellen zu Myotuben das Komplement-Assay durchgeführt (s. Tabelle 2.1 A). Hierfür wurden die Löcher der Mikrotiterplatte abgesaugt und zweimal mit 200 µl PBS gewaschen. Dann wurden in je sechs Löcher 200 µl des Normalserum-Puffers als Behandlungsgruppe oder des VAP/BSA-Puffers als Kontrollgruppe gegeben. Der Normalserum-Puffer enthielt Normalserum in einer Konzentration von 1:5, 1:10 oder 1:20 verdünnt mit VAP/BSA-Puffer. Nach einer unterschiedlich langen Inkubationsdauer von 30, 20 oder 5 Minuten bei 37°C wurden alle Löcher zweimal mit PBS gewaschen, und es wurde 200 µl Propidiumiodid-Lösung je Loch zugegeben. Nach erneuter Inkubation von 30 Minuten wurde wieder zweimal mit PBS gewaschen und je Loch 200 µl SMG-Medium zugegeben, um während des Auszählens Signalunterschiede zwischen den Löchern durch kontinuierliche Aufnahme von Propidiumiodid in die Zelle zu vermeiden. Im Anschluss wurde im Fluoreszenzmikroskop die mittlere Anzahl der beschädigten Zellen bestimmt, die durch Aufnahme von Propidiumiodid ein leuchtend-rotes Signal im Zellinnern zeigten.

Tab. 2.1 A: Behandlungsschema der Zellen im Komplement-Assay zur mikroskopischen Analyse

Myoblasten bzw. Myotuben nach Differenzierung im Fusionsmedium											
2x Waschen mit PBS											
VAP/BSA N = 6			NHS 1:20 N = 6			NHS 1:10 N = 6			NHS 1:5 N = 6		
Inkubation mit Normalserum [Minuten]											
30	20	5	30	20	5	30	20	5	30	20	5
2x Waschen mit PBS											
Zugabe von Propidiumiodid											
Inkubation, 30 Minuten											
2x Waschen mit PBS											
Zugabe von SMG-Medium											
Zellzahlbestimmung unter dem Mikroskop											

Das Komplement-Assay wurde mit Zellen von N = 2 Gesunden sowie N = 2 Patienten mit LGMD2B durchgeführt.

2.1.5.2 Komplement-Assay mit CD55 / CD59-Antikörper

Für das Komplement-Assay mit Antikörperbehandlung (s. Tabelle 2.1 B) wurden die Löcher der Mikrotiterplatte abgesaugt und zweimal mit 200 µl PBS gewaschen.

Tab. 2.1 B: Behandlungsschema der Zellen im Komplement-Assay mit Antikörperbehandlung zur mikroskopischen Analyse

Myoblasten bzw. Myotuben nach Differenzierung im Fusionsmedium			
2x Waschen mit PBS			
Ohne Antikörper	Anti-CD55-Antikörper	Anti-CD59-Antikörper	Anti-CD55- + Anti-CD59-Antikörper
N = 6	N = 6	N = 6	N = 6
Inkubation, 30 Minuten			
2x Waschen mit PBS			
NHS 1:5	NHS 1:5	NHS 1:5	NHS 1:5
Inkubation, 30 Minuten			
2x Waschen mit PBS			
Zugabe von Propidiumiodid			
Inkubation, 30 Minuten			
2x Waschen mit PBS			
Zugabe von SMG-Medium			
Zellzahlbestimmung unter dem Mikroskop			

Dann wurden in je sechs Löcher 100 µl Antikörperlösung (Antikörper gelöst in PBS) mit entweder Anti-CD55-Antikörper oder Anti-CD59-Antikörper oder Anti-CD55- + Anti-CD59-Antikörper gegeben. Die Konzentrationen der Antikörper betragen: für Anti-CD55-Antikörper 5,0 µg / ml – für Anti-CD59-Antikörper 10,0 µg / ml – für Anti-CD55- + Anti-CD59-Antikörper 5,0 bzw. 10,0 µg / ml. In einer Versuchsreihe wurde zur Untersuchung einer Konzentrationsreihe von Anti-CD55-Antikörper derselbe mit einer Dosis von 1,0 µg / ml, 2,5 µg / ml, 5,0 µg / ml bzw. 10,0 µg / ml verwendet. Das vierte Sixplet wurde nicht mit Antikörperlösung behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die Löcher zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden je 200 µl des Normalserum-Puffers in einer Konzentration von 1:5 zu allen vier Sixplets gegeben. Nach einer Inkubationsdauer von

30 Minuten wurden die Löcher zweimal mit PBS gewaschen, und es wurde 200 µl Propidiumiodid-Lösung je Loch zugegeben. Nach erneuter Inkubation von 30 Minuten wurde wieder zweimal mit PBS gewaschen und je Loch 200 µl SMG-Medium zugegeben, um während des Auszählens Signalunterschiede zwischen den Löchern durch kontinuierliche Aufnahme von Propidiumiodid in die Zelle zu vermeiden. Im Anschluss wurde im Fluoreszenzmikroskop die mittlere Anzahl der beschädigten Zellen bestimmt, die durch Aufnahme von Propidiumiodid ein leuchtend-rotes Signal im Zellinnern zeigten.

Das Komplement-Assay mit Antikörperbehandlung wurde mit Zellen von N = 2 Gesunden sowie N = 2 Patienten mit LGMD2B durchgeführt.

2.1.5.3 Statistische Analyse

Der Unterschied der im Mittel der Sixplets beschädigten Zellen zwischen den Behandlungsgruppen jeweils eines Patienten wurde mittels Varianzanalyse unter Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche bestimmt. Der Unterschied der im Mittel beschädigten Zellen in Gesunden und LGMD2B-Patienten wurde mittels T-Test für unabhängige Paarvergleiche bestimmt.

2.1.6 Durchflusszytometrische Untersuchung

2.1.6.1 Präparation der Myotuben

Analog zum Vorgehen in 2.1.3.5 wurden zur Durchführung des Komplement-Assays Myoblasten zu Myotuben differenziert. Dazu wurden Myoblasten bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % expandiert, dann analog zu 2.1.3.4 gewaschen, trypsiniert, im Waschmedium zentrifugiert, dann zweimal mit PBS (gekühlt auf 4°C) unter Zentrifugation gewaschen. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Zellpellet nun in 2 ml Fusionsmedium je Flakon suspendiert und in einen Flakon transferiert, in dem zuvor 8 ml erwärmtes Fusionsmedium vorgelegt wurden. Der Flakon wurde nun für zwei Tage inkubiert, bevor nach Waschen mit PBS ein Medienwechsel mit Fusionsmedium vorgenommen wurde. Am vierten Tag wurde die Differenzierung der Myotuben im Mikroskop anhand der Morphologie kontrolliert.

2.1.6.2 Charakterisierung von Myotuben und Myoblasten im Zytometer

Jede Einzelmessung wurde mit 10000 gezählten Ereignissen durch den Zytometer beendet, so dass sich alle Einzelmessergebnisse auf eine Mittelung von 10000 Auslesevorgängen

beziehen.

Die epitheliale Natur der Zellen bedingte eine deutliche Adhärenz im Messsystem des Zytometers, so dass nach jeder Messung der Zytometer über mindestens 1 Minute solange gespült wurde, bis die Zellfreiheit im System verifiziert war, indem über 30 Sekunden nicht mehr als 30 Ereignisse gemessen wurden. In ein zweites FACS-Röhrchen mit einer Myoblasten-Probe wurde 1 µl einer Propidiumiodidlösung mit einer Konzentration von 1 µg / ml gegeben. Für diese so markierte Suspension wurden die Systemvariablen des Zytometers zur optimalen Zellanalyse gemäß Abschnitt 2.1.6.4 eingestellt.

2.1.6.3 Präparation der Zellen für das Komplement-Assay

Am vierten Tag der Differenzierung wurden die Myotuben sowie die entsprechenden Myoblasten mit PBS gewaschen, durch Trypsination abgelöst und mit Waschmedium (gekühlt auf 4°C) zentrifugiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS (gekühlt auf 4°C) unter Zentrifugation gewaschen. Dann wurde das Zellpellet wieder mit 12 ml PBS suspendiert und auf sechs 15 ml Röhrchen aliquotiert. Nach Zentrifugation wurde in je drei Röhrchen je 3 ml von entweder VAP/BSA-Puffer oder Normalserum-Puffer mit NHS 1:5 bzw. NHS 1:20 gegeben. Die Röhrchen wurden für 30 Minuten inkubiert und im Anschluss zweimal mit 12 ml PBS unter Zentrifugation gewaschen. Dann wurde das Zellpellet mit 2 ml PBS suspendiert und auf Eis gestellt. Zur Messung im Zytometer wurde das mit VAP/BSA-Puffer behandelte 15 ml Röhrchen 1 resuspendiert und 400 µl Zellsuspension in FACS-Röhrchen a gegeben.

2.1.6.4 Kalibrierung und Einstellung des Zytometers

Das für die vorliegende Untersuchung verwendete Messprinzip beruht auf den unterschiedlichen Absorptions- bzw. Emissionsspektren von Propidiumiodid (PI), welches in beschädigte Zellen aufgenommen wird, von intakten Zellen aber ausgeschlossen bleibt. Eine Messprobe wird durch einen Laser mit einem Energiemaximum von 495 nm bestrahlt und das Maximum des Emissionsspektrums im Bereich von 639 nm registriert. Dieses sogenannte PI-Signal lässt sich in Beziehung zum Forward- bzw. Sideward Scatter setzen und erlaubt so eine Quantifizierung der Signale in so genannte Ereignisse.

Zunächst wurde das Messfenster im Zytometer durch Messung der nur mit PBS behandelten Zellsuspension verifiziert. Dazu wurde das 15 ml Röhrchen 0 resuspendiert und daraus eine 400 µl Probe in FACS-Röhrchen x gegeben. Durch Messung dieser Probe wurde der Fluoreszenzdetektor FL3 des PI-Signals so adjustiert, dass im Histogramm des gemessenen

Fluoreszenzsignals die Funktion von Anzahl der Ereignisse und logarithmischer Signalstärke am ehesten einer Gauss'schen Verteilung mit dem Maximum bei 10^1 und den Asymptoten bei 10^0 bzw. 10^2 entsprach. Nach Spülen des Zytometers wurde das 15 ml Röhrchen 0 erneut resuspendiert und daraus eine neue 400 μ l Probe in FACS-Röhrchen y gegeben und durch Messung der Probe die Adjustierung überprüft bzw. nachgeregelt. Anschließend wurde analog mit der FACS-Probe z verfahren.

Die Einstellungen des FACSCalibur-Cytometers für die Messung waren verhältnismäßig konstant: Sowohl Zellpopulationen aus der Messung von Myoblasten als auch solche, die nach der Differenzierung von Myotuben bestimmt wurden, ließen sich gleichermaßen mit derselben Konfiguration darstellen. Diese gewährleistete auch eine weitestgehende Unabhängigkeit der Darstellung von Zellen unterschiedlicher Patienten. Je nach Patient bedurfte es lediglich einer Adjustierung des FL3-Detektors um max. 5-8 %, um eine optimale Darstellung der Zellpopulationen im Fluoreszenz-Histogramm zu erhalten. Tabelle 2.1. C zeigt eine Übersicht über die Zytometer-Einstellungen.

Tab. 2.1 C: Einstellungen des Zytometers zur durchflusszytometrischen Messung von Myoblasten und Myotuben

Detectors/Amps				
Param	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E-1	2.50	Lin
P2	SSC	350	1.00	Lin
P5	FL3	379	1.00	Log
Threshold				
Primary Parameter		FSC	Value: 0	
		FL3-H	Value: 0	
Secondary Parameter		None		
Compensation				
FL3 – 0.0 % FL2			FL3 – 0.0 % FL4	

2.1.6.5 Messung der Komplement-Assays im Zytometer

Nach Kalibrierung des Zytometers wurde dieser gespült, und aus dem 15 ml Röhrchen 1 wurden nach Resuspendieren 400 µl Suspension sowie 1 µl einer Propidiumiodidlösung mit einer Konzentration von 1 µg / ml in das FACS-Röhrchen a gegeben. Diese so markierte Suspension wurde im Zytometer gemessen. Nach anschließendem Spülen des Zytometers wurde das 15 ml Röhrchen 1 erneut resuspendiert, daraus eine neue 400 µl Probe sowie Propidiumiodidlösung in FACS-Röhrchen b gegeben und gemessen. Analog wurde mit der Probe FACS-Röhrchen c verfahren, bevor Proben a, b und c aus dem mit NHS 1:20 behandelten 15 ml Tube 2 auf entsprechende Weise analysiert wurden (s. Tabelle 2.1 D). Zur Minimierung von Störgrößen durch spontanen Zelltod bisher nicht gemessener Proben wurden die einzelnen Behandlungsgruppen in folgender Reihenfolge gemessen:

VAP/BSA Röhrchen 1 → NHS 1:20 Röhrchen 2 → NHS 1:5 Röhrchen 3 → NHS 1:20 Röhrchen 4 → NHS 1:5 Röhrchen 5 → VAP/BSA Röhrchen 6 → NHS 1:5 Röhrchen 7 → VAP/BSA Röhrchen 8 → NHS 1:20 Röhrchen 9.

Tab. 2.1 D: Behandlungsschema der Zellen im Komplement-Assay zur durchflusszytometrischen Analyse

Myotuben bzw. Myoblasten										
2x Waschen mit PBS										
PBS		VAP/BSA			NHS 1:20			NHS 1:5		
15 ml Röhrchen 0	15 ml Röhrchen 1	15 ml Röhrchen 6	15 ml Röhrchen 8	15 ml Röhrchen 2	15 ml Röhrchen 4	15 ml Röhrchen 9	15 ml Röhrchen 3	15 ml Röhrchen 5	15 ml Röhrchen 7	
Inkubation, 30 Minuten										
2x Waschen mit PBS										
FACS- Röhr- chen x	FACS- Röhr- chen a	FACS- Röhr- chen d	FACS- Röhr- chen g	FACS- Röhr- chen a	FACS- Röhr- chen d	FACS- Röhr- chen g	FACS- Röhr- chen a	FACS- Röhr- chen d	FACS- Röhr- chen g	
FACS- Röhr- chen y	FACS- Röhr- chen b	FACS- Röhr- chen e	FACS- Röhr- chen h	FACS- Röhr- chen b	FACS- Röhr- chen e	FACS- Röhr- chen h	FACS- Röhr- chen b	FACS- Röhr- chen e	FACS- Röhr- chen h	
FACS- Röhr- chen z	FACS- Röhr- chen c	FACS- Röhr- chen f	FACS- Röhr- chen i	FACS- Röhr- chen c	FACS- Röhr- chen f	FACS- Röhr- chen i	FACS- Röhr- chen c	FACS- Röhr- chen f	FACS- Röhr- chen i	
Zugabe von Propidiumiodid										
Messung im Zytometer (10000 Ereignisse je Einzelmessung)										

Zur quantitativen Analyse wurde im Histogramm des Fluoreszenzsignals von Propidiumiodid ein Messgitter (Gate) 2 auf alle Ereignisse unterhalb der Schwelle der Eigenfluoreszenz des Systems gesetzt. Die Eigenfluoreszenz wurde wie oben beschrieben durch Kalibrierung des Lasers für die mit PBS behandelten Zellen der Proben x, y und z angepasst. Gate 2 gab damit die Ereignisse der gesunden Zellpopulation PI⁻ wieder. Ein Gate 1 wurde für alle Ereignisse oberhalb der Eigenfluoreszenz gesetzt, so dass Gate 1 + Gate 2 = 100% der Ereignisse ergaben.

Der Anteil toter Zellen, die Propidiumiodid aufgenommen hatten, wurde damit errechnet durch $PI^+ [\%] = \text{Gate 1} : \text{Gate 2} \times 100$.

2.1.6.6 Statistische Analyse

Aus den Messungen der FACS-Röhrchen a-i wurde der Mittelwert des toten Zellanteils PI+ gebildet. Dessen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen der Myoblasten bzw. Myotuben desselben Patienten wurde mittels Varianzanalyse unter Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche bestimmt. Der Unterschied der Mittelwerte zwischen Myoblasten und Myotuben desselben Patienten wurde mittels T-Test für unabhängige Paarvergleiche bestimmt. Der Unterschied der Mittelwerte von Myotuben bzw. Myoblasten zwischen Gesunden und LGMD2B-Patienten wurde ebenfalls mittels T-Test für unabhängige Paarvergleiche bestimmt.

2.2 Experimente im Mausmodell

Zur Überprüfung des aus den *in vitro* Experimenten gewonnenen Modells zum Pathomechanismus der Muskelschädigung in LGMD2B-Patienten wurde im Mausmodell die therapeutische Wirkung eines monoklonalen Antikörpers gegen den Komplementfaktor C5 unter histologischen Kriterien untersucht. Dazu wurde in einem Vorversuch die Wirkung des spezifischen Antikörpers mit einer Antikörper-Isotypkontrolle sowie einer Behandlung mit Albumin verglichen. In einem zweiten Schritt wurden die Fallzahlen erhöht sowie der Gruppenvergleich auf Anti-C5-Antikörper-Behandlung sowie Isotypkontrolle beschränkt, damit eine eindeutige Analyse bei geringem Behandlungseffekt möglich wird.

2.2.1 Chemikalien

<i>Biopsie</i>										
Gum Tragacanth	<p><u>Enthält:</u></p> <p>Tragacanth-Pulver - 10,5 g</p> <p>Glycerin - 4,2 ml</p> <p>Thymol - wenige Stücke</p> <table border="1"> <tr> <td>Glycerin</td> <td>Fa. Merck (Darmstadt), 1.040933.1000</td> <td>Kat.Nr.</td> </tr> <tr> <td>Thymol</td> <td>Fa. Synopharm (Barsbüttel), 222575-0003]</td> <td>Kat.Nr.</td> </tr> <tr> <td>Tragacanth-Pulver</td> <td colspan="2">gummiartige Ausscheidung, die aus Stamm und Ästen von Astragalus gummifer labill. ausfließt, Fa. Synopharm (Barsbüttel), Kat.Nr. 226071-0002</td> </tr> </table>	Glycerin	Fa. Merck (Darmstadt), 1.040933.1000	Kat.Nr.	Thymol	Fa. Synopharm (Barsbüttel), 222575-0003]	Kat.Nr.	Tragacanth-Pulver	gummiartige Ausscheidung, die aus Stamm und Ästen von Astragalus gummifer labill. ausfließt, Fa. Synopharm (Barsbüttel), Kat.Nr. 226071-0002	
Glycerin	Fa. Merck (Darmstadt), 1.040933.1000	Kat.Nr.								
Thymol	Fa. Synopharm (Barsbüttel), 222575-0003]	Kat.Nr.								
Tragacanth-Pulver	gummiartige Ausscheidung, die aus Stamm und Ästen von Astragalus gummifer labill. ausfließt, Fa. Synopharm (Barsbüttel), Kat.Nr. 226071-0002									
Isopentan	2-Methylbutan Fa. Merck (Darmstadt), Kat.Nr. 1.06056.1000									
<i>Färbung</i>										
Ethanol	100% Ethanol vergällt, Fa. Herbeta-Arzneimittel (Berlin), Kat.Nr. 216925									
Gill's Hematoxylin	Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill II, Fa. Merck (Darmstadt), Kat.Nr. 1.05175.0500									
Gomori's Trichrome	<p><u>Enthält:</u></p> <p>Aqua destillata - 100 ml</p> <p>Chromotrope 2R - 0,6 g</p> <p>Eisessig - 1 ml</p> <p>Fast Green FCF - 0,3 g</p> <p>Wolframatophosphorsäure - 0,6 g</p> <p><u>Zubereitung:</u></p> <p>Ingredienzien vermischen und mit Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von 3,4 anheben. Vor jedem Gebrauch filtern.</p> <table border="1"> <tr> <td>Chromotrope</td> <td>Fa. Sigma-Aldrich (München), Kat.Nr.</td> </tr> </table>	Chromotrope	Fa. Sigma-Aldrich (München), Kat.Nr.							
Chromotrope	Fa. Sigma-Aldrich (München), Kat.Nr.									

	2R	C-3143
	Eisessig	0,2 % Ethansäure, CH ₃ COOH, in Aqua destillata, Ethansäure: Fa. Merck (Darmstadt), Kat.Nr. 1.00063.1011
	Fast Green FCF	Fa. Applichem (Darmstadt), Kat.Nr. A.1401.0010
	Wolframato- phosphorsäure	Phosphotungstic Acid, Fa. Merck (Darmstadt), Kat.Nr. 1.00583.0100
	Natrium- hydroxid	NaOH, 1 M, Fa. Merck (Darmstadt), Kat.Nr. 1.06498.1000
Xylol	Xylol > 98%, C ₆ H ₄ (CH ₃) ₂ , Fa. J.T. Baker (Griesheim), Kat.Nr. 8080	
<i>Mikroskopie</i>		
Eindeck- medium	CytoSeal 60 mounting medium, Fa. Richard-Allan Scientific (Kalamazoo), Kat.Nr. 8310-4	
Gefrierkleber	Einbettmedium für Gefrierschnitte, Fa. Leica (Bensheim), Kat.- Nr. 020108926	

Material und Geräte

<i>Biopsie</i>	
Schere	Präparierschere nach Mayo, Fa. B. Braun Aesculap (Melsungen), Kat. Nr. BC544R
Pinzette	Anatomische Pinzette, Chirurgische Pinzette, Fa. B. Braun Aesculap (Melsungen), Kat. Nr. BD025R bzw. BD527R
Korkplättchen	Durchmesser 3 cm, Fa. Knollmeyer (Klosterfelde)
<i>Färbung</i>	
Cryotom	MICROM HM 500 OM, Fa. Microm (Walldorf)
	Schnittmesser Cryostatmesser für Cryostat Microm HM 500, Fa. Knollmeyer (Klosterfelde), Kat.Nr. 152020
Filterpapier	Faltenfilter MN 615 ¼, Ø 90 mm, Fa. Macherey-Nagel (Düren), Kat.Nr. 531009
pH-Meter	WTW Typ: pH537, Fa. WTW (Weilheim)
<i>Mikroskopie</i>	
Objektträger	Super Frost Color, 76 x 26 mm, geschliffen, ISO-Norm 8037, Fa. Menzel (Bielefeld)
Deckplättchen	Menzel Deckgläser #1, 22 x 22 mm, Fa. Menzel (Bielefeld)
Mikroskop	Leica DM LB2 Auflichtmikroskop (Bensheim)

2.2.2 Tiere

Alle Schritte des Versuchsprotokolls (Tierversuchsnummer G0127/06) wurden streng nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes gemäß BGBI. I sowie im Einklang mit den Richtlinien zur Umsetzung des Tierschutzgesetzes an der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Die Behandlung der Tiere erfolgte nach bestem Wissen und Gewissen mit größter persönlicher Sorgfalt und Rücksichtnahme.

In den Versuchsreihen wurden N = 48 weibliche Mäuse vom Stamm SJL/J mit einem

Gewicht von ca. 25 g und in einem Alter von 20 Wochen bei Behandlungsbeginn untersucht. Die Tiere stammten aus der Zucht Charles-River Laboratories, Sulzberg, Deutschland.

2.2.3 Spezifischer Antikörper, Isotypkontrolle und Behandlungskontrolle

BB5.1 ist ein monoklonaler Antikörper der Maus vom Typ IgG mit einer Wirkung analog zum humanen Antikörper Eculizumab, welcher am C5 Komplement-Protein angreift. Hier beginnt die gemeinsame Wegstrecke der unterschiedlichen Komplementaktivierungswege, in deren Verlauf die Einzelbestandteile sich zum Membran-Angriffs-Komplex zusammensetzen. BB5.1 blockiert spezifisch die Aufspaltung von C5 in pro-inflammatorische Moleküle⁷⁵ und verhindert so die Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes C5b-9 (MAC) in Mäusen⁷⁶.

In der vorliegenden Studie wurde BB5.1 mit einer Dosis von 40 mg / kg Körpergewicht eingesetzt, was in vivo die akute vaskuläre Abstoßungsreaktion bei Allotransplantation des Herzens bei der Maus verhindert⁷⁷.

Der Antikörper HFN ist ebenfalls ein monoklonales Mausglobulin vom Typ IgG, hat jedoch eine Spezifität für die Fc-Region von IgG-Antikörpern, so dass er als Isotypkontrolle für den Ausschluß einer unspezifischen Wirkung im Vergleich zu BB5.1 eingesetzt werden kann.

Der spezifische Antikörper BB5.1 sowie der Antikörper HFN zur Isotypkontrolle wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Firma Alexion Pharmaceuticals, Cheshire, USA. Die mit einer Konzentration von 4,23 mg / ml (BB5.1) bzw. 4,80 mg / ml (HFN) in PBS gelieferten Substanzen wurden unter sterilen Bedingungen sowie unter Schutz einer Zellkulturarbeitsbank mit PBS verdünnt bis zu einer Konzentration von 1,62 mg / ml. Das zur Behandlungskontrolle eingesetzte, aus Mausserum hergestellte, Albumin stammte von der Fa. Sigma-Aldrich (Kat.-Nr. A-3139) und wurde ebenfalls in PBS zu einer Konzentration von 1,62 mg / ml gelöst. Die Injektionslösungen wurden ständig auf 8°C gekühlt gelagert sowie zu Injektionszwecken auf Eis transportiert.

2.2.4 Behandlungsschema und Injektion

Zunächst wurde in einem Vorversuch mit n = 18 Tieren 3 Gruppen zu je 6 Tieren gebildet: Gruppe A wurde mit dem C5-spezifischen BB5.1-Antikörper behandelt, Gruppe B mit der Isotypkontrolle HFN und Gruppe C mit Albumin zur Behandlungskontrolle. In der anschließenden zweiten Versuchsreihe wurden n = 30 Tiere behandelt, wobei je die Hälfte BB5.1 bzw. HFN erhielten. Tabelle 2.2 zeigt eine Übersicht über das Behandlungsschema.

Tab. 2.2: Übersicht des Behandlungsschemas der Tiere zur Komplement-blockade im Mausmodell

1. Versuchsreihe			2. Versuchsreihe	
N = 6	N = 6	N = 6	N = 15	N = 15
Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E
Anti-C5-Ak	Isotypkontrolle	Albuminkontroll e	Anti-C5-Ak	Isotypkontrolle
1 mg je Injektion, 10 Injektionen alle 2-3 Tage				

Je 1 mg BB5.1, HFN oder Albumin wurden den Tieren dreimal wöchentlich alle 2-3 Tage bis zu einer Gesamtzahl von 10 Injektionen intraperitoneal injiziert. Die Injektionsmenge von 0,62 µl je Dosis wurde dabei halbiert auf je eine Körperseite appliziert, um die Kreislauf- und Gewebebelastung zu minimieren. Die Injektion erfolgte mittels einer 1 ml Einmal-Spritze sowie einer 27 G Kanüle.

2.2.5 Tötung, Dissektion und Konservierung

Die Tötung der Tiere erfolgte in CO₂-Narkose. Unter Spreizung der Faszie mit der Pinzette wurde anschließend der M. quadriceps möglichst weit proximal in der Inguinalfalte quer zum Verlauf durchschnitten, bevor der distale Ansatz auf Höhe des Knies ebenfalls quer durchtrennt wurde. Unter leichtem Zug an der distalen, medialen Seite des Muskels wurde durch Scherenschlag der rückseitige Anteil von distal nach proximal von der dorsalen Faszie bis zur völligen Ablösung des Muskels vom Oberschenkel getrennt.

Beim Einbetten der Muskelprobe auf einem Korkplättchen mit Gum Tragacanth wurde die Infiltration der Muskeloberfläche mit Tragacanth vermieden, um Artefakte auszuschließen. Anschließend wurde die Probe für ca. 10 Sekunden in Isopentan geschwenkt, welches durch Lagerung in flüssigem Stickstoff auf ca. -150 °C gekühlt im gerade noch flüssigen Aggregatzustand war. Dies verhindert das Kochen des Stickstoffs bei anschließender Einbringung der Probe in den Stickstofftank, wodurch sich Gasblasen bilden und das Gewebe hierdurch isolieren würden, was eine homogene Durchsetzung verhindert und Gewebsartefakte verursacht. Nach Temperatúrausgleich zwischen Isopentan und

Muskelprobe wurde diese in flüssigen Stickstoff schockgefroren, um Artefakte durch Eiskristallwachstum bei langsamem Einfrieren zu vermeiden. Zuletzt wurde der Muskel bis zur mikroskopischen Analyse bei -80°C gelagert.

2.2.6 Färbung der Muskelschnitte

Zunächst wurden Querschnitte der Muskelproben mit einer Schichtdicke von $10\ \mu\text{m}$ mittels eines Cryotoms angefertigt. Dann wurden jeweils zwei Querschnitte in einem Schichtabstand von ca. $70\ \mu\text{m}$ hergestellt. Bei Zimmertemperatur wurden die Gewebeproben luftgetrocknet und anschließend gefärbt.

Die Deckplättchen mit den Muskelschnitten wurden zunächst über 5 Min. in gefiltertem Gill's Hematoxylin gefärbt und anschließend unter fließendem Aqua destillata über 4 Min. gespült, bis das abtropfende Wasser klar war. Es folgte die Färbung in Gomori's Trichrome über 10 Min. und dann die Differenzierung durch Übergießen der Schnitte mit 0,2 % Eisessig bis der Ablauf farblos war. Nun wurde mit 100 % Ethanol dehydriert, indem die Deckplättchen schnell nacheinander in drei Becken je 10 Mal getaucht wurden. Abschließend wurde in Xylol durch je 10-maliges Tauchen nacheinander in zwei Becken fixiert. Die Schnitte wurden dann mithilfe des Eindeckmediums auf Objektträgern platziert und luftdicht eingedeckt.

2.2.7 Histologische Auswertung

Die $N = 96$ Muskelschnitte wurden unter dem Auflichtmikroskop bei 20- bzw. 40-facher Vergrößerung analysiert. Als histologische Kriterien, nach denen das Präparat untersucht wurde, dienten: binnenständige Nuclei, Fasersplitting, Nekrosen, entzündliche Infiltrate, regenerierende Fasern, kleinster sowie größter Faserdurchmesser.

In jedem Präparat wurde das Auftreten dieser Kriterien durch Auszählen quantifiziert sowie die absolute Zahl der Muskelfasern im Präparat abzüglich der auftretenden Fasersplittings bestimmt.

Der minimale und maximal Faserdurchmesser eines Präparats wurde bestimmt durch Aufsuchen der nach Augenmaß jeweils kleinsten bzw. größten intakten Faser. In dieser wurde die kürzeste Distanz gemessen, die die Faser in der Mitte zweiteilt. Zusätzlich wurde aus dem minimalen und maximalen Faserdurchmesser eines Präparates das arithmetische Mittel als Maß für die Varianz des Durchmessers bestimmt.

Schließlich wurde das Auftreten der Kriterien in jeder Kategorie auf die Zahl der Fasern im

jeweiligen Präparat bezogen und auf 100 Fasern heruntergerechnet. Dann wurde aus den Werten der beiden Präparate derselben Maus der Mittelwert dieses Prozentsatzes gebildet, um Ungenauigkeiten beim Zählen für die Auswertung zu minimieren.

2.2.8 Statistische Analyse

Der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich der Gesamtheit der histologischen Parameter, die quantitativ metrisch bestimmt wurden, wurde mittels Varianzanalyse (Analysis of Variance Funktion, ANOVA) mit nachfolgender Bonferroni-Korrektur bestimmt. Semiquantitativ bestimmte Parameter wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Rangsummengleichheit überprüft. Bezüglich der Häufigkeit des Auftretens von Nekrosen wurde zur Bestimmung von Gruppenunterschieden zwischen „normaler“ und „beeinträchtigter“ Muskelbiopsie der Likelihood-Quotient Chi-Quadrat-Test benutzt. Zur Berechnung der statistischen Größen wurde die Software SPSS 12.0 verwendet.

Unterschiede, die sich nicht durch den Chi-Quadrat-Test abbilden ließen, wurden mittels der Effektstärke bewertet. Durch die Effektstärke wird die Stärke des Zusammenhangs zwischen Gruppenzugehörigkeit der Teilnehmer und dem Interventionsergebnis quantifiziert⁷⁸. Die Effektstärke spezifiziert dabei den Wirkungsunterschied zwischen Versuchsgruppe und Kontrollgruppe. Die Effektstärke d ist analog zur z -Transformation⁷⁹ und kann somit wie ein z -Wert interpretiert werden. Das heißt, dass ein Ergebnis von $d = 0$ kein Effekt ist. Ein positives Ergebnis zeigt sich bei einem Behandlungserfolg (vorausgesetzt, dass Gruppe 1 bei der Berechnung die Versuchsgruppe ist). Eine negative Effektstärke findet sich, wenn es bei der Kontrollgruppe im Verlaufe des Beobachtungszeitraums zu größeren Veränderungen eines Parameters kommt als in der Gruppe mit einer Behandlung⁸⁰.

Zur Optimierung der Schätzung von Effektstärken wird die Mittelwertsdifferenz beider Gruppen standardisiert, indem eine mittlere (gepoolte) Streuung benutzt wird⁸¹. Somit erhält man die adjustierte Effektstärke d_u , die sich berechnet nach:

$$d_u = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)n_1 + n_2 - 2}{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}$$

mit \bar{x} : Arithmetisches Mittel

n : Stichprobenumfang

s : Standardabweichung

Ist die Effektstärke kleiner oder gleich $d_u = 0,2$, dann handelt es sich um einen kleinen Effekt. Bei $d_u > 0,8$ spricht man von großen Effekten und dazwischen von mittleren Effekten⁷⁸.

Nach dieser Klassifikation wird geprüft, ob d_u signifikant von Null verschieden ist. Hierzu wird folgende approximativ normalverteilte Testgröße verwendet⁷⁸:

$$z = \frac{d_u}{\sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2} + \frac{d_u^2}{2(n_1 + n_2)}}}$$

Liegt z im Ablehnungsbereich der Standardnormalverteilung, kann man die Nullhypothese, welche besagt, dass die Effektstärke gleich Null ist, ablehnen und damit einen Effekt nachweisen.

3 Ergebnisse

3.1 Experimente in der Zellkultur

3.1.1 Mikroskopische Merkmale

Die morphologischen Merkmale der Zellen in Kultur entsprachen der üblichen Charakteristik⁸², wobei die Zellen der Normalkontrollen und diejenigen der LGMD2B-Patienten unter Sicht des Auges nicht von einander unterscheidbar waren (s. Abb. 3.1.1 A).

Lediglich im Wachstumsverhalten zeigte sich eine deutliche Einschränkung der Proliferationsfähigkeit von LGMD2B-Myoblasten gegenüber der Normalkontrolle; unter den LGMD2B-Zellen vermehrten sich die Zellen des Patienten aus der Familie A besonders langsam.

Während die im Vergleich zu Myoblasten breitere Gestalt des Myotuben-Somas durch die vollendete Zellfusion unter dem Mikroskop gut nachvollziehbar war (s. Abb. 3.1.1 A), trat die Vielzähligkeit der Zellkerne in den Myotuben zumeist erst im Zuge des Komplement-Assays hervor: hier wurden durch das PI-Signal mehrere Nuclei pro Zelle deutlich sichtbar (s. Abb. 3.1.1 A & B).

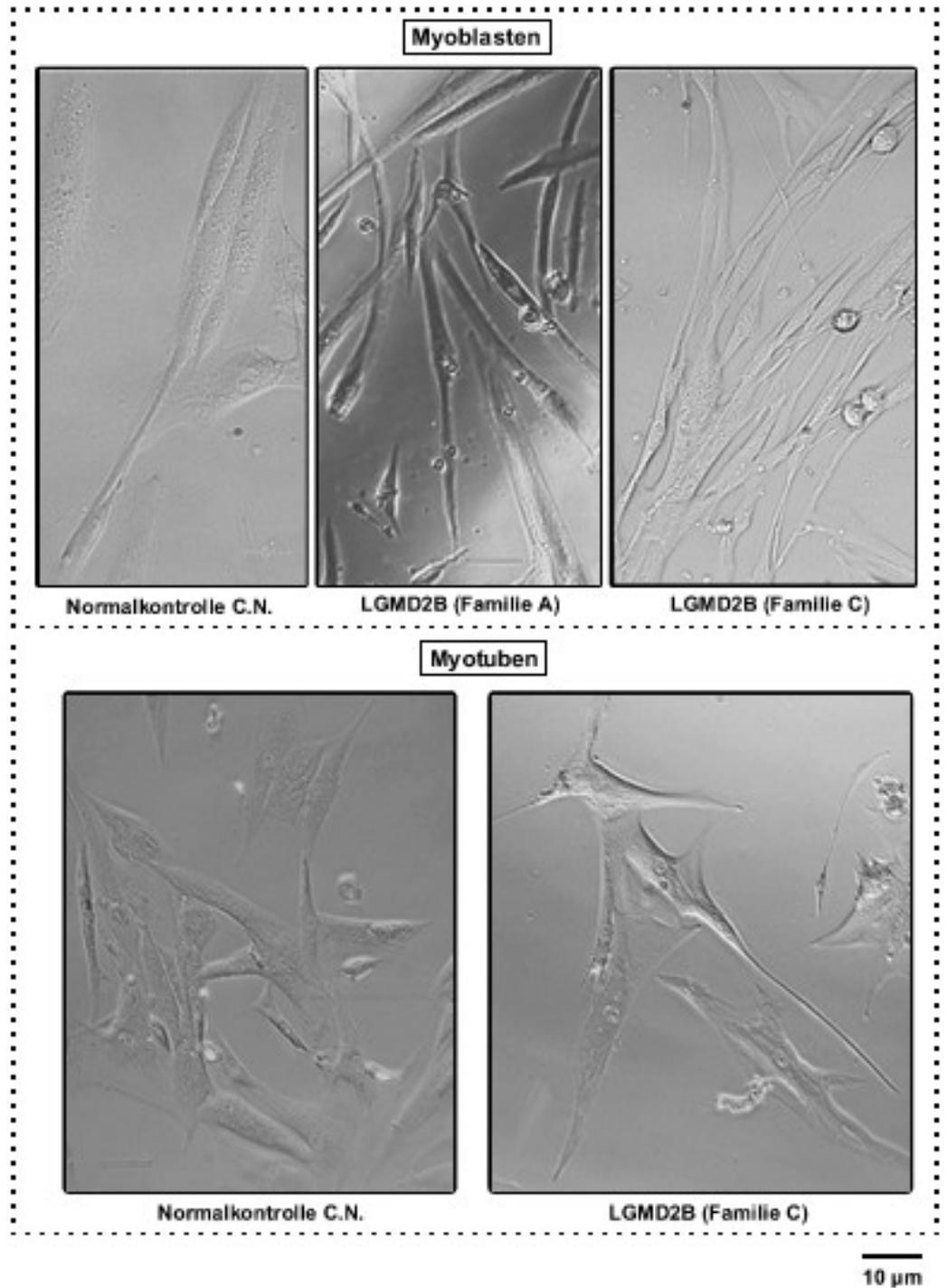


Abb. 3.1.1 A: Morphologie von Myoblasten und Myotuben in der Zellkultur

Lichtmikroskopische Aufnahme humaner Muskelzellen in Zellkultur: keine morphologischen Unterschiede zwischen Normalkontrolle und muskeldystrophen Patienten derselben Differenzierungsstufe (Myoblasten bzw. Myotuben) erkennbar (vgl. Zellen der oberen bzw. der unteren Reihe); deutlich breitere syncytiale Form der Myotuben (untere Reihe) im Vergleich zu Myoblasten (obere Reihe).

LGMD2B (Familie C)

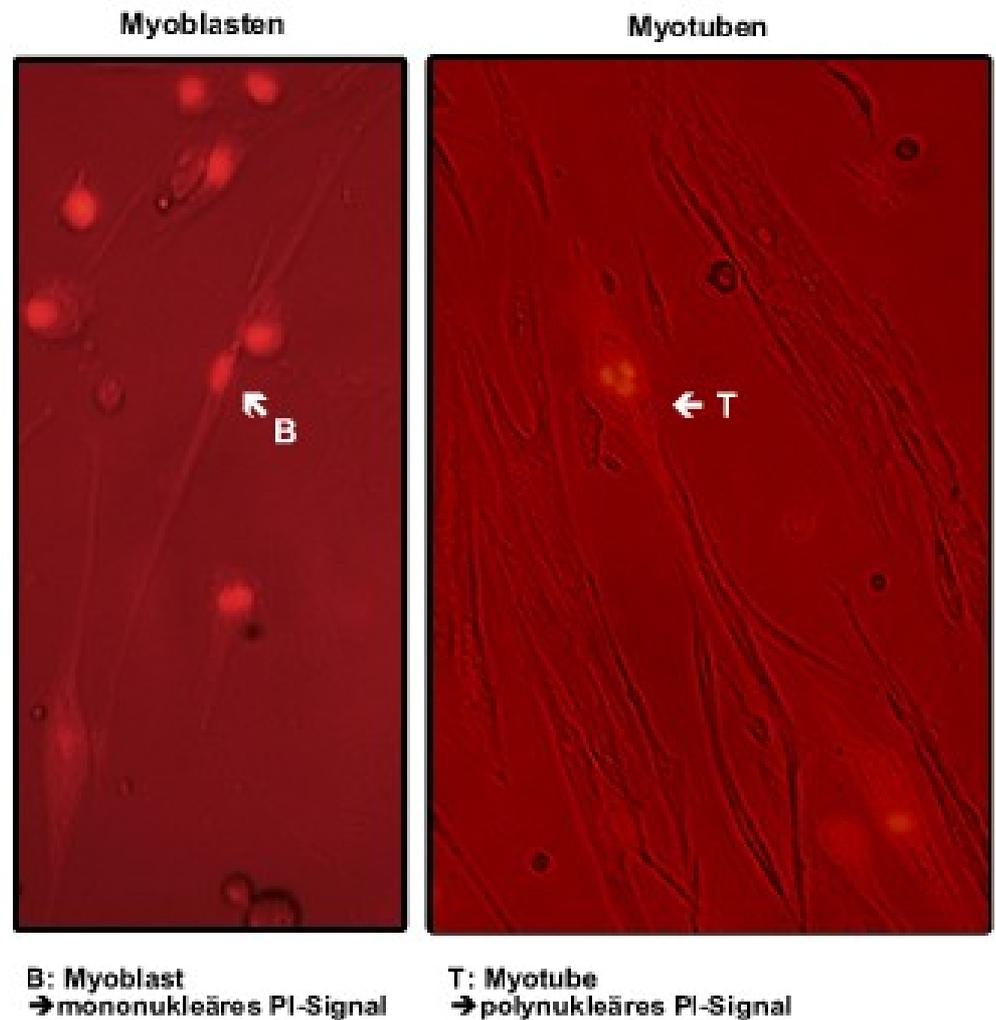


Abb. 3.1.1 B: Signale PI-positiver Myoblasten und Myotuben im Komplement-Assay

Lichtmikroskopische Aufnahme humaner Muskelzellen im Komplement-Assay nach Zugabe von PI: geschädigte Muskelzellen nahmen PI auf, welches im Nucleus kumuliert, so dass im gefilterten Licht ein leuchtend rotes Signal sichtbar wurde. Während bei den Myoblasten ein einziges Signal je Zelle auftrat (linke Seite), zeigten mehrzahlige Signale die Polynuklearität der Myotuben an (rechte Seite).

3.1.2 Komplement-Assays in der Mikroskopie

Die zur Auswertung der Zellschädigung im Komplement-Assay verwendete PI-Signalanalyse ermöglichte eine eindeutige Unterscheidung zwischen geschädigten und nicht-geschädigten Zellen. Hierbei war ebenso der polynukleäre Charakter der Myotuben im Vergleich zu den

Myoblasten deutlich sichtbar, was gleichzeitig der Bestätigung der vollständigen Differenzierung der Myotuben aus der Myoblastenkultur diente (s. Abb. 3.1.1 A & B).

Eine Übersicht der Analyse von Mittelwerten und Standardabweichungen der Zahl PI-positiver Zellen geordnet nach Mutation, Zelltyp und Behandlungsgruppen geben die Tab. 3.1.2 A und 3.1.2 B.

Tab. 3.1.2 A: Propidiumiodid-positive Zellen aus Normalkontrollen

	Patient	Zell- typ	Behandlungsschema	Einwirk- zeit	Experi- ment	Mittelwert ± SD [%]		
Normalkontrolle	C.N.	Blasten	PBS	---	A1	5,456 ± 1,061		
			VAP/BSA	30 Min.	A1	5,936 ± 0,558		
			NHS 1:10	10 Min.	A1	8,065 ± 1,139		
			NHS 1:10	30 Min.	A1	10,951 ± 0,519		
		Myotuben	VAP/BSA	30 Min.	A2	0,213 ± 0,186		
			NHS 1:20	30 Min.	A2	0,137 ± 0,061		
			NHS 1:10	30 Min.	A2	0,505 ± 0,303		
			NHS 1:5	30 Min.	A2	0,187 ± 0,126		
			NHS 1:5	30 Min.	A3	2,738 ± 1,684		
			NHS 1:5 + CD55	30 Min.	A3	4,296 ± 2,567		
			NHS 1:5 + CD59	30 Min.	A3	6,548 ± 4,814		
			NHS 1:5 + CD55 & CD59	30 Min.	A3	5,884 ± 2,224		
			K.S.	Myotuben	VAP/BSA	30 Min.	B	0,043 ± 0,140
					NHS 1:5	5 Min.	B	0,325 ± 0,124
	NHS 1:10	10 Min.			B	0,310 ± 0,157		
	NHS 1:5	20 Min.			B	0,278 ± 0,236		

Tab. 3.1.2 B: Propidiumiodid-positive Zellen mit LGMD2B-Mutation

	Muta- tion	Zell- typ	Behandlungsschema	Einwirk- zeit	Experi- ment	Mittelwert ± SD [%]
LGMD 2B	Familie A	Myotuben	PBS	---	D	11,646 ± 3,207
			VAP/BSA	10 Min.	D	18,008 ± 2,164
			VAP/BSA	30 Min.	D	18,391 ± 2,601
			NHS 1:10	10 Min.	D	24,122 ± 7,033
			NHS 1:10	30 Min.	D	86,667 ± 9,919
			NHS 1:5	30 Min.	D	84,596 ± 11,982
	Familie B	Myotuben	VAP/BSA	30 Min.	E	0,193 ± 0,143
			NHS 1:5	30 Min.	E	3,357 ± 2,805
			NHS 1:5 + CD55	30 Min.	E	5,743 ± 1,265
			NHS 1:5 + CD59	30 Min.	E	4,901 ± 1,298
	Familie C	Blasten	PBS	---	C1	1,431 ± 0,690
			VAP/BSA	30 Min.	C1	1,254 ± 0,156
			NHS 1:10	10 Min.	C1	0,115 ± 0,387
			NHS 1:10	30 Min.	C1	0,642 ± 0,190
			NHS 1:5	30 Min.	C1	3,330 ± 1,234
			NHS 1:5 + CD55	30 Min.	C1	3,567 ± 2,041
			NHS 1:5 + CD59	30 Min.	C1	4,403 ± 2,228
			NHS 1:5 + CD55 & CD59	30 Min.	C1	3,731 ± 2,226
		Myotuben	PBS	---	C2	12,797 ± 1,964
			VAP/BSA	30 Min.	C2	14,091 ± 1,033
			NHS 1:20	30 Min.	C2	40,330 ± 34,679
			NHS 1:10	10 Min.	C2	10,247 ± 2,509
			NHS 1:10	30 Min.	C2	9,065 ± 1,732
			NHS 1:5	30 Min.	C2	58,200 ± 19,854
			PBS	---	C3	0,003 ± 0,001
			NHS 1:10	1 Min.	C3	0,006 ± 0,002
			NHS 1:10	3 Min.	C3	0,009 ± 0,002
			NHS 1:10	5 Min.	C3	0,014 ± 0,008
			NHS 1:10	7 Min.	C3	0,019 ± 0,008
			NHS 1:10	10 Min.	C3	0,059 ± 0,029
			NHS 1:5	30 Min.	C4	0,205 ± 0,036
			NHS 1:5 + CD55 (1,0 µg)	30 Min.	C4	0,048 ± 0,001
NHS 1:5 + CD55 (2,5 µg)			30 Min.	C4	0,121 ± 0,017	
NHS 1:5 + CD55 (5,0 µg)			30 Min.	C4	0,187 ± 0,009	
NHS 1:5 + CD55 (10,0 µg)			30 Min.	C4	0,277 ± 0,051	
NHS 1:5			30 Min.	C5	2,668 ± 1,263	
NHS 1:5 + CD55	30 Min.	C5	1,557 ± 0,895			
NHS 1:5 + CD59	30 Min.	C5	1,454 ± 1,391			
NHS 1:5 + CD55 & CD59	30 Min.	C5	2,634 ± 2,136			

3.1.2.1 *Differentielle Wirkung von Komplement auf Zelltypen und Mutationen*

Die Wirkung von Komplement auf Muskelzellen ist abhängig vom Zelltyp und von der Konzentration sowie der Dauer der Komplement-Attacke.

Der Anteil PI-positiver Zellen (s. Abb. 3.1.1 B) der Normalkontrolle C.N. lag für die Myoblasten unter Komplementattacke deutlich höher als unter Kontrollbedingungen (PBS bzw. VAP/BSA-Puffer). Unter Kontrollbedingungen war im Vergleich zur längsten Einwirkdauer des Komplements etwa die Hälfte weniger PI-positive Signale zu finden. Bei einer Ausgangszahl toter Zellen von ca. 5,5 % unter Kontrollbedingungen bewirkte die Komplementattacke eine Schädigung von ebenfalls ca. 5,5 % ursprünglich vitaler Myoblasten mit einem Absolutwert von 11% PI-positiven Zellen (s. Abbildung 3.1.2 A).

Bei Myoblasten aus der LGMD2B-Familie C lag der Ausgangswert toter Zellen niedriger, und die Komplementattacke bewirkte auf der ersten Konzentrationsstufe keine Erhöhung PI-positiver Signale. Verglichen mit der Kontrollbehandlung (PBS bzw. VAP/BSA-Puffer) verursachte die Komplementattacke etwa 2,5-mal mehr tote Zellen, wenngleich der Effekt mit einer Schädigung von absolut ca. 2 % der Zellen geringer ausfiel als bei der Normalkontrolle C.N. (s. Abbildung 3.1.2 A).

Für die Myotuben hingegen zeigte sich bei den Normalkontrollen der Patienten C.N. sowie K.S. keine relevante Schädigung der Zelle durch Komplementattacke. Selbst bei der höchsten Komplementkonzentration unter der jeweils längsten Einwirkzeit fand sich eine Schädigung zwischen ca. 0,1 und 0,3 % der Zellen, wobei die relative Zunahme PI-positiver Signale zwischen ca. 0,2 und 0,3 % lag (s. Abbildung 3.1.2 B).

Im Gegensatz hierzu reagierten die Myotuben des Patienten aus der LGMD2B-Familie C sehr empfindlich auf die Komplementattacke. Bereits unter kurzen Einwirkzeiten ließ sich eine zunehmende Zellschädigung feststellen, die innerhalb eines Versuchssets in der 10. Minute der Komplementattacke eine 5-fache Zahl PI-positiver Signale im Vergleich zur Kontrollbehandlung erreicht wurde. Der Komplementeffekt blieb dabei mit einer Schädigung von absolut ca. 0,5 % der Zellen zunächst gering (s. Abbildung 3.1.2 B). Das unterschiedliche Ausmaß der zellschädigenden Wirkung von Komplement auf Myotuben zeigte sich nicht nur zwischen Normalkontrollen und LGMD2B-Patienten, sondern war auch abhängig von der zugrunde liegenden LGMD2B-Mutation:

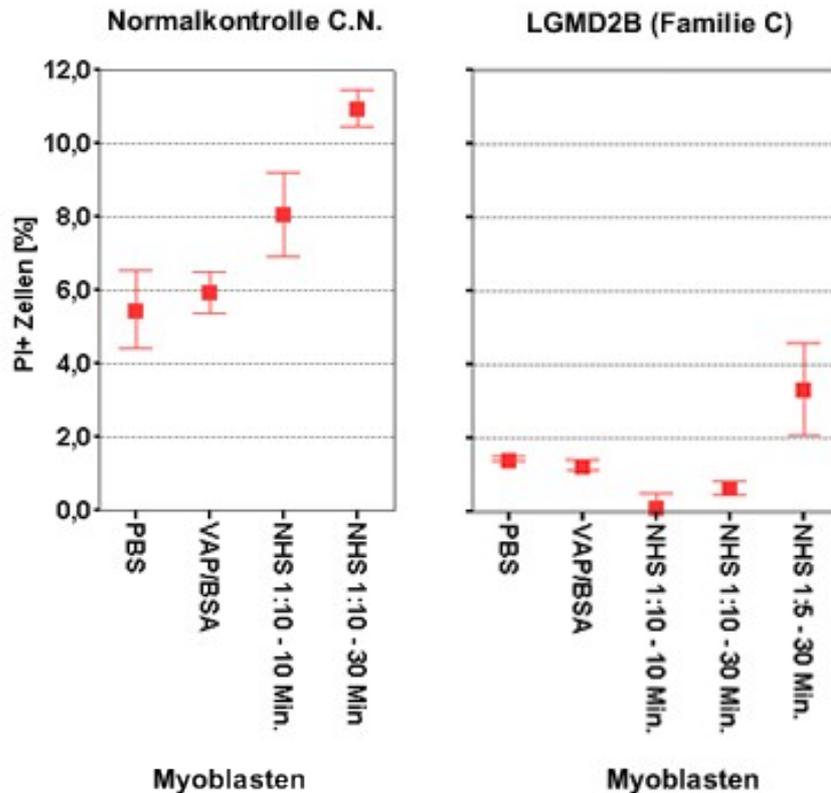


Abb. 3.1.2 A: Vergleich der Wirkung von Komplement auf Myoblasten aus Normalkontrolle und LGMD2B-Familie C

Anteil PI-positiver Myoblasten unter Kontrollbehandlung (PBS, VAP/BSA) und ansteigenden Komplement-Konzentrationen (NHS): bei der Normalkontrolle C.N. unter Komplementattacke deutlich höherer Anteil PI-positiver Zellen als unter Kontrollbehandlung. Weiterer Anstieg mit zunehmender Komplementkonzentration (linke Seite). Für LGMD2B-Myoblasten der Familie C ab einer NHS-Konzentration von NHS 1:5 vermehrt geschädigte Zellen im Vergleich zur PBS-Behandlung (rechts)

Die Zellen des Patienten aus der Familie A wiesen zunächst einen Anstieg der PI-positiven Signale bei zunehmender Einwirkzeit auf und erreichten unter der mittleren Komplementkonzentration ein Maximum, unter dem der Wert bei höchster Komplementkonzentration nur unwesentlich zurücklag. Bei im Vergleich zu den Myotuben der anderen LGMD2B-Patienten deutlich höherer Ausgangszahl toter Zellen von ca. 20 % verursachte die Komplementattacke eine Vervierfachung der Schädigung auf über 85 % der Zellen im Vergleich zur Kontrollbehandlung (s. Abbildung 3.1.2 C).

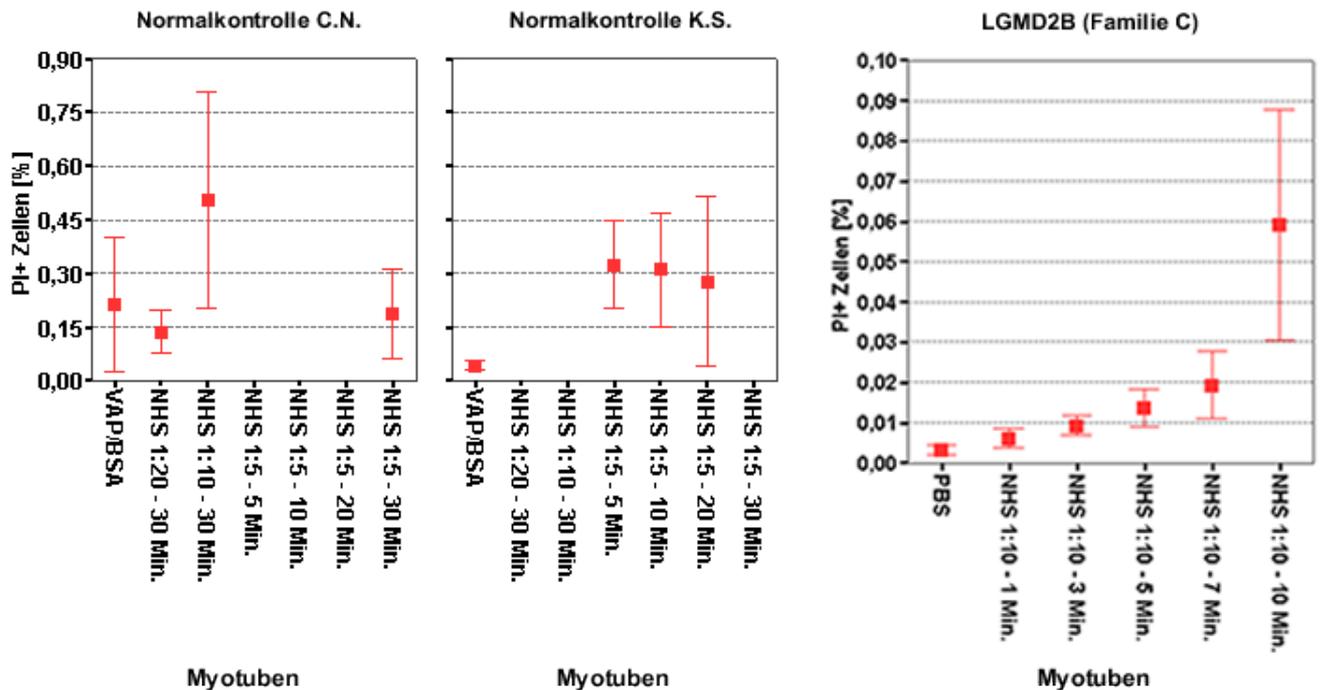


Abb. 3.1.2 B: Vergleich der Wirkung von Komplement auf Myotuben aus Normalkontrollen und LGMD2B-Familie C

Prozentualer Anteil PI-positiver Myotuben unter Kontrollbehandlung (PBS, VAP/BSA) und ansteigenden Komplement-Konzentrationen (NHS): bei den Normalkontrollen C.N. und K.S. zeigte sich keine relevante Zellschädigung unter Komplementattacke, gemessen an der geringen Zunahme PI-positiver Signale im Vergleich zur Kontrollbehandlung (linke Seite und Mitte). Die LGMD2B-Myoblasten der Familie C reagierten hingegen sehr empfindlich auf die Komplementattacke, wobei die Schädigung bereits nach wenigen Minuten deutlich wurde (rechts).

Die Myotuben des Patienten der Familie B erwiesen sich als besonders komplementempfindlich: gegenüber der Kontrollbehandlung stieg die Zahl PI-positiver Zellen um mehr als das 17-fache auf absolut ca. 3,5 %.

Im Fall der LGMD2B-Familie C verursachten zwei Konzentrationsstufen der Komplementattacke einen Anstieg toter Zellen um das ca. 3- (NHS 1:20) bzw. 4-fache (NHS 1:5) verglichen mit der Kontrolle. Die absolute Zahl PI-positiver Signale lag hier mit ca. 60 % zwischen der LGMD2B-Familie A und –Familie B.

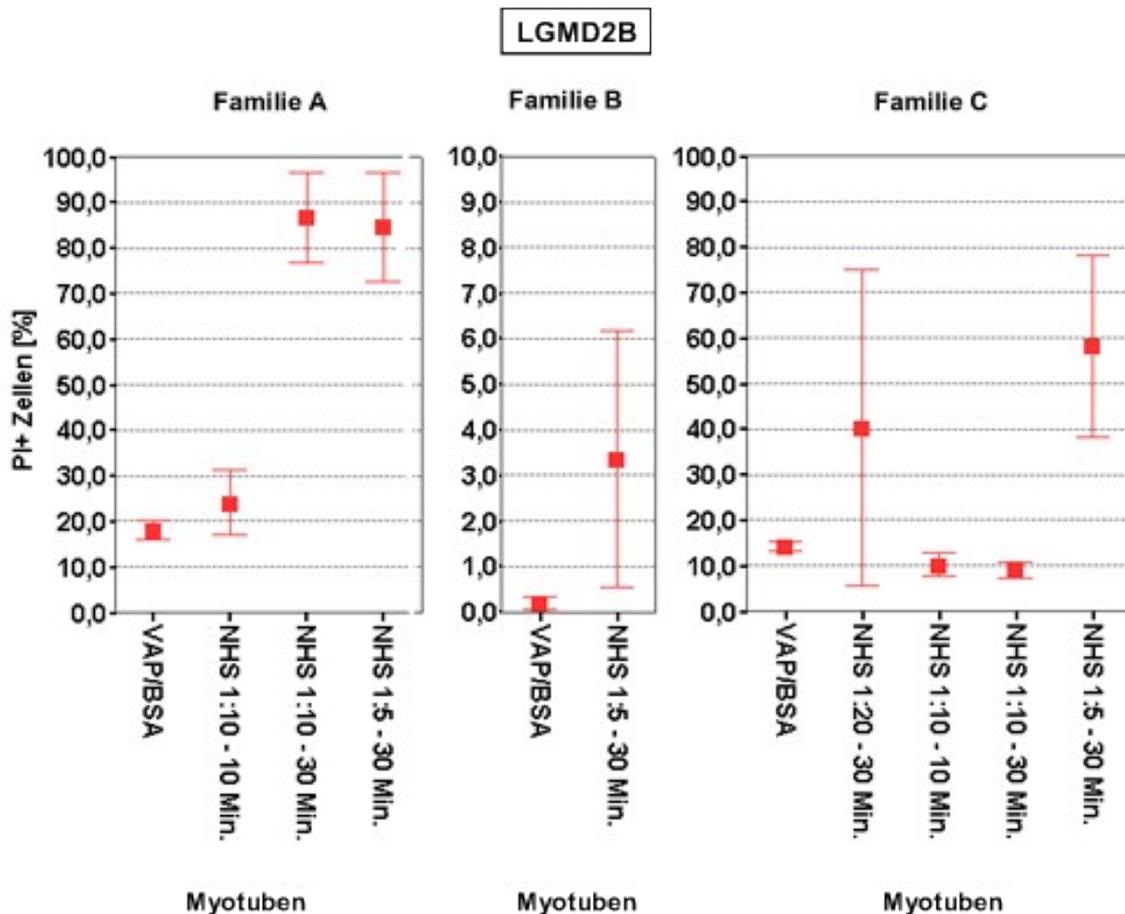


Abb. 3.1.2 C: Vergleich der Wirkung von Komplement auf LGMD2B-Myotuben der Familien A, B und C

Prozentualer Anteil PI-positiver Myotuben unter Kontrollbehandlung (VAP/BSA) und ansteigenden Komplement-Konzentrationen (NHS): im Vergleich zur Kontrollbehandlung wiesen die Zellen der unterschiedlichen LGMD2B-Familien eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Komplement auf. Die Schädigungsrate der Zellen nahm unter der höchsten Komplementkonzentration in der Reihenfolge Familie B > Familie A > Familie C ab.

Zur Darstellung der Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Komplement zwischen den Patientengruppen wurde die Ratio PI-positiver Zellen (PI Ratio) aus Komplement-behandelten gegenüber unbehandelten Mikrotiter-Löchern herangezogen. Hierdurch wurde die unterschiedliche Empfindlichkeit der Gruppen auf unspezifische Einwirkungen (siehe unterschiedliche Anteile PI-positiver Zellen bei Kontrollbehandlung) normiert, so dass ein direkter Gruppenvergleich möglich wurde (s. Abbildung 3.1.2 D).

Bei der Aufschlüsselung der PI Ratio nach LGMD2B-Mutationen zeigte sich die höchste Empfindlichkeit gegenüber Komplement für die Zellen aus der Familie A, bei denen die PI Ratio mit $7,8 \pm 3,1$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) ca. 7-fach über der Normalkontrolle lag ($0,95 \pm 0,67$, $P < 0,001$). Die PI Ratio der Zellen aus der LGMD2B-Familie B lag mit $3,8 \pm 1,4$ fast 4-fach, die der Familie C mit $2,0 \pm 0,5$ ca. 2-fach über der Norm ($P < 0,01$ bzw. $P < 0,05$).

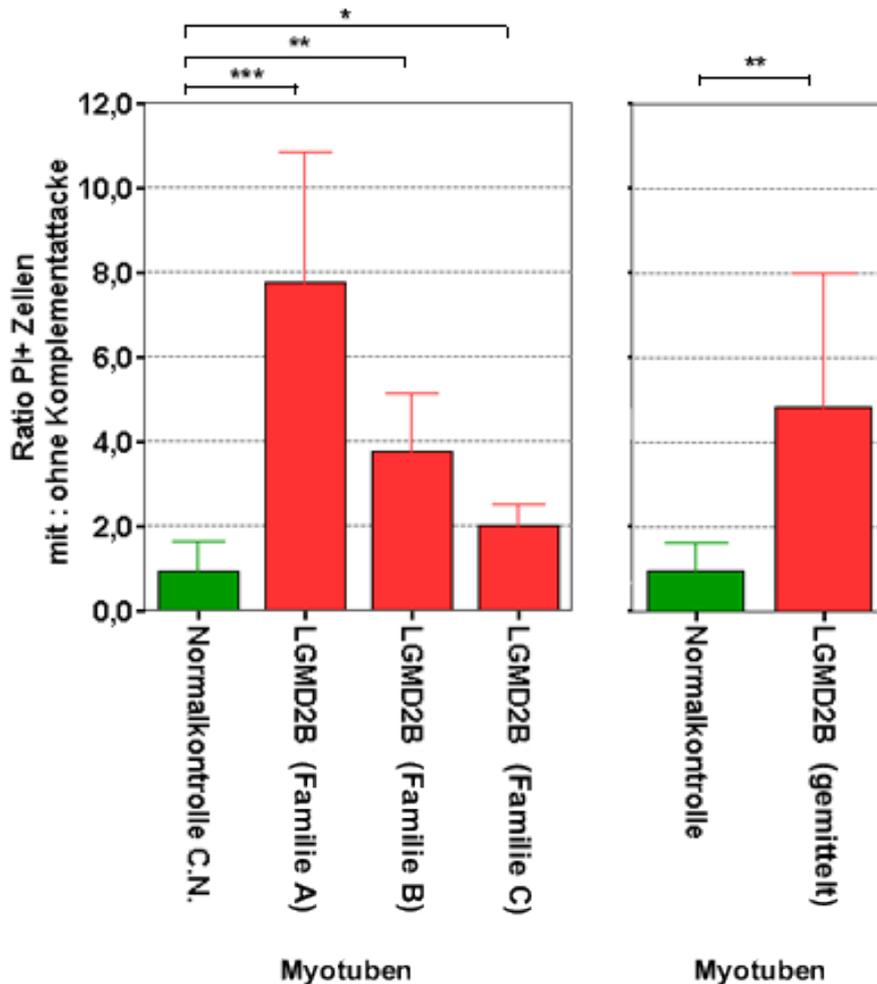


Abb. 3.1.2 D: Vergleich der Komplementempfindlichkeit von Myotuben aus Normalkontrolle und LGMD2B-Familien A, B und C

Verhältnis der Zahl PI-positiver Myotuben unter Komplementtacke gegenüber Kontrollbehandlung: bei der Normalkontrolle annähernd gleiche Zahl geschädigter Zellen sowohl unter Kontrollbehandlung als auch unter Komplementtacke (grün), deutlich höhere Empfindlichkeit der LGMD2B-Zellen aller Familien. Statistische Signifikanz: $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) oder $P < 0,001$ (***)

Die Gesamtbetrachtung der LGMD2B-Mutationen (PI Ratio $4,8 \pm 3,1$) verglichen mit der Normalkontrolle zeigte eine nahezu 5-fach erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Komplement ($P < 0,01$).

3.1.2.2 Wirkung von Anti-CD55/59-Antikörpern unter Komplement-Attacke

Die Behandlung von Myotuben mit Anti-CD55- oder Anti-CD59-Antikörpern unter der Komplement-Attacke zeigte eine Zunahme der PI-positiven Signale sowohl bei der Normalkontrolle C.N. als auch bei Zellen der LGMD2B-Familie B.

Für die Normalkontrolle erhöhte sich der Anteil PI-positiver Signale unter Vorbehandlung mit Anti-CD55-Antikörper um das 1,6-fache auf ca. 4,3 %, mit Anti-CD59-Antikörper um das 2,4-fache auf ca. 6,5 % und mit kombinierter Anti-CD55/59-Antikörperbehandlung um das 2,2-fache auf ca. 5,9 % (s. Abbildung 3.1.2 E).

Der Anteil PI-positiver Zellen aus der LGMD2B-Familie B erhöhte sich von 3,4 % bei reiner Komplementbehandlung hingegen nur um das 1,7-fache (auf 5,7 %) bzw. 1,4-fache (auf 4,9 %) bei Anti-CD55-Antikörper- bzw. Anti-CD59-Antikörperbehandlung.

Bei dem LGMD2B-Patienten aus der Familie C war kein Anstieg von PI-positiven Zellzahlen und damit toter Zellen nachweisbar. Während sich hier für die Myoblasten noch ein 1,1-facher (Anti-CD55- bzw. Anti-CD55&59-Antikörperbehandlung) bzw. 1,3-facher Anstieg (Anti-CD59-Antikörperbehandlung) der PI-positiven Zellen gegenüber reiner Komplementattacke zeigte, war für die Myotuben ein Absinken der PI-positiven Zellzahlen zu beobachten: für alleinige Anti-CD55- bzw. Anti-CD59-Antikörperbehandlung sank die Zahl toter Zellen von ca. 2,7 % auf ca. 1,6 % bzw. 1,5 % um 41% bzw. 45%, bei kombinierter Behandlung um 3% im Vergleich zur reinen Komplementbehandlung. Die Resistenz von Myotuben aus Normalkontrollen gegenüber Komplementattacken konnte also teilweise aufgehoben werden sowohl durch Anti-CD55 als auch Anti-CD59-Antikörperbehandlung. Die Kombinationsbehandlung aus beiden Antikörpern erbrachte keine synergistische Wirkung.

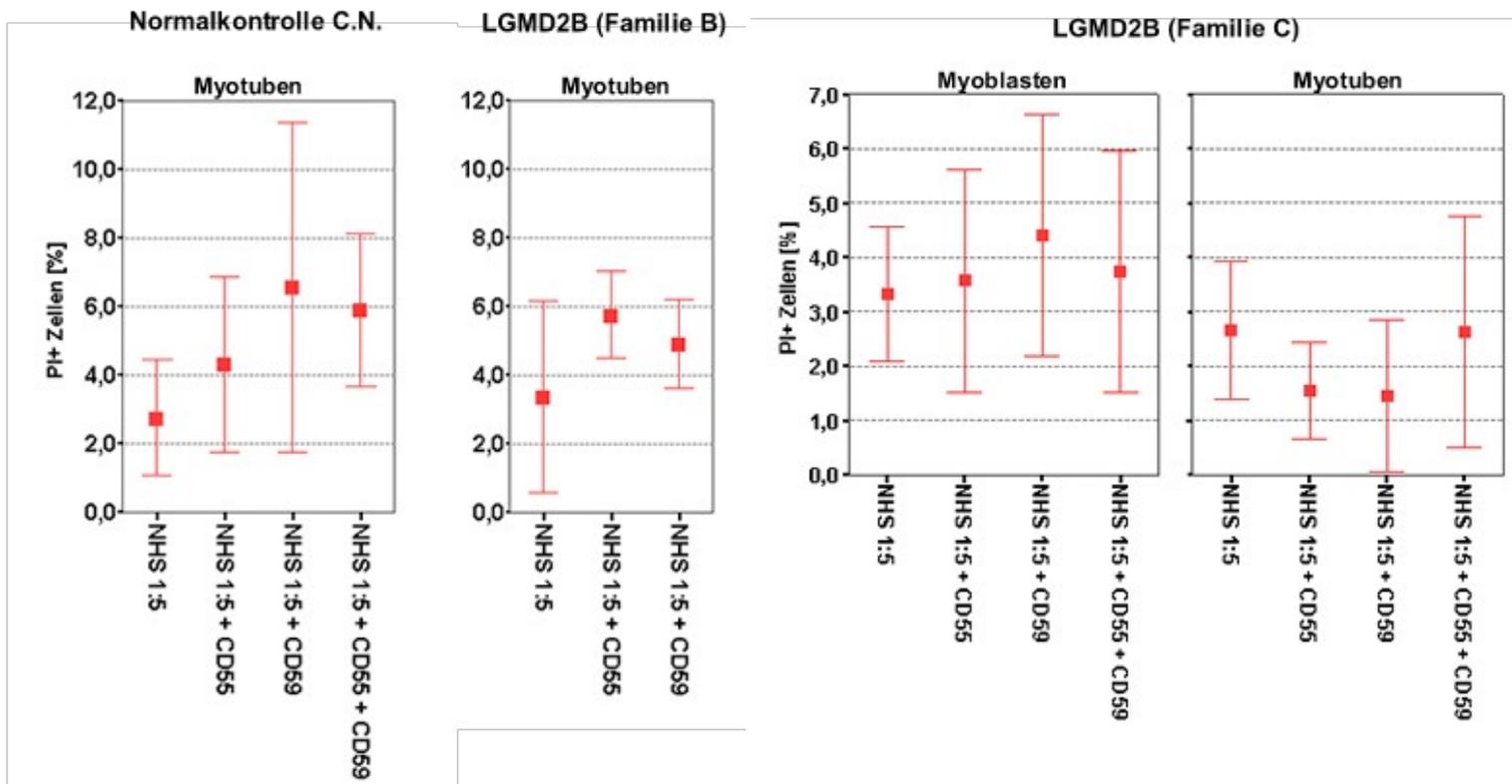


Abb. 3.1.2 E: Wirkung von Komplement auf Myoblasten und Myotuben nach CD55, CD59- oder CD55+CD59-Behandlung

Die fehlende Zunahme der komplement-vermittelten Zellschädigung von Myotuben unter CD55-Blockade im Vergleich zur reinen Komplementbehandlung beweist die funktionelle Bedeutung der fehlenden CD55-Expression. Trotz kombinierter CD55- / CD59-Blockade erfolgt nur ein geringer Zuwachs geschädigter Myotuben aus Normalkontrollen und LGMD2B-Patienten. Dies weist auf eine von CD59 unabhängige Komplementregulation von Myotuben hin.

Selbst bei hoher Antikörperkonzentration von 10,0 µg / ml zeigte sich nur eine minimale Reduktion der Komplement-Resistenz: im Vergleich zur reinen Komplementbehandlung nahm der Anteil PI-positiver Zellen unter Anti-CD55-Antikörper-Behandlung von 0,21 % auf 0,28 % zu (s. Abbildung 3.1.2 F).

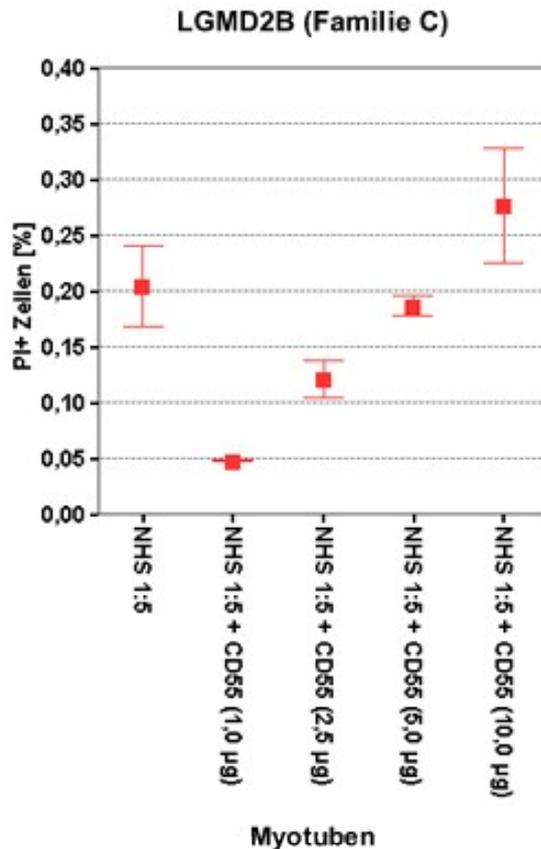


Abb. 3.1.2 F: Dosisabhängige Wirkung von Anti-CD55-Antikörpern auf Myotuben

Prozentualer Anteil PI-positiver Myotuben unter einheitlicher Komplement-Konzentration (NHS 1:5) und ansteigender anti-CD55-Antikörper-Konzentrationen: im Vergleich zur Ausgangsbehandlung ohne anti-CD55-Antikörper nimmt die Zahl geschädigter Zellen zunächst ab, erreicht bei einer anti-CD55-Antikörper-Konzentration von 5,0 µg/ml den Ausgangswert und steigt erst bei der dann doppelten Konzentration über den Ausgangswert an. Eine toxische Wirkung des anti-CD55-Antikörpers ist deshalb in der im restlichen Versuchsprotokoll verwendeten Konzentration von 5,0 µg/ml nicht nachzuweisen.

Darüber hinaus ergab die Antikörperbehandlung, dass bei der niedrigsten Antikörperkonzentration zwar eine deutliche Reduktion des PI-Signals im Vergleich zur Komplementattacke ohne Antikörper auftrat, die Zahl toter Zellen mit zunehmender Antikörperkonzentration jedoch nahezu linear zunahm und bei der höchsten Antikörperkonzentration einen Wert erreichte, der über der Kontrollbehandlung ohne Antikörper lag (s. Abbildung 3.1.2 F). Somit kann eine toxische Wirkung des Antikörpers in der verwendeten Konzentration ausgeschlossen werden.

3.2 Durchflusszytometrische Analyse

3.2.1 Morphologie von Zellen und Zellpopulationen

Mit den unter Abschnitt 2.1.6.4 genannten Einstellungen des Zytometers war eine konstante Zellpopulation sowohl für Myoblasten wie für Myotuben abzubilden. Hierbei ließen sich beide Zelltypen am deutlichsten mit denselben Geräteeinstellungen darstellen, wobei keine Differenzierung des Typs anhand der Verteilung im Forward-Sideward-Scatter möglich war: Myoblasten wie Myotuben zeigten bei den gegebenen Messeinstellungen die gleiche Populationsverteilung (s. Abb. 3.2.1 A).

Dabei ließen sich die durch Komplement geschädigten Zellen als deutliche Population (Population G1) sowohl im Forward als auch im Sideward Scatter von der Menge vitaler Zellen (Population G2) abgrenzen.

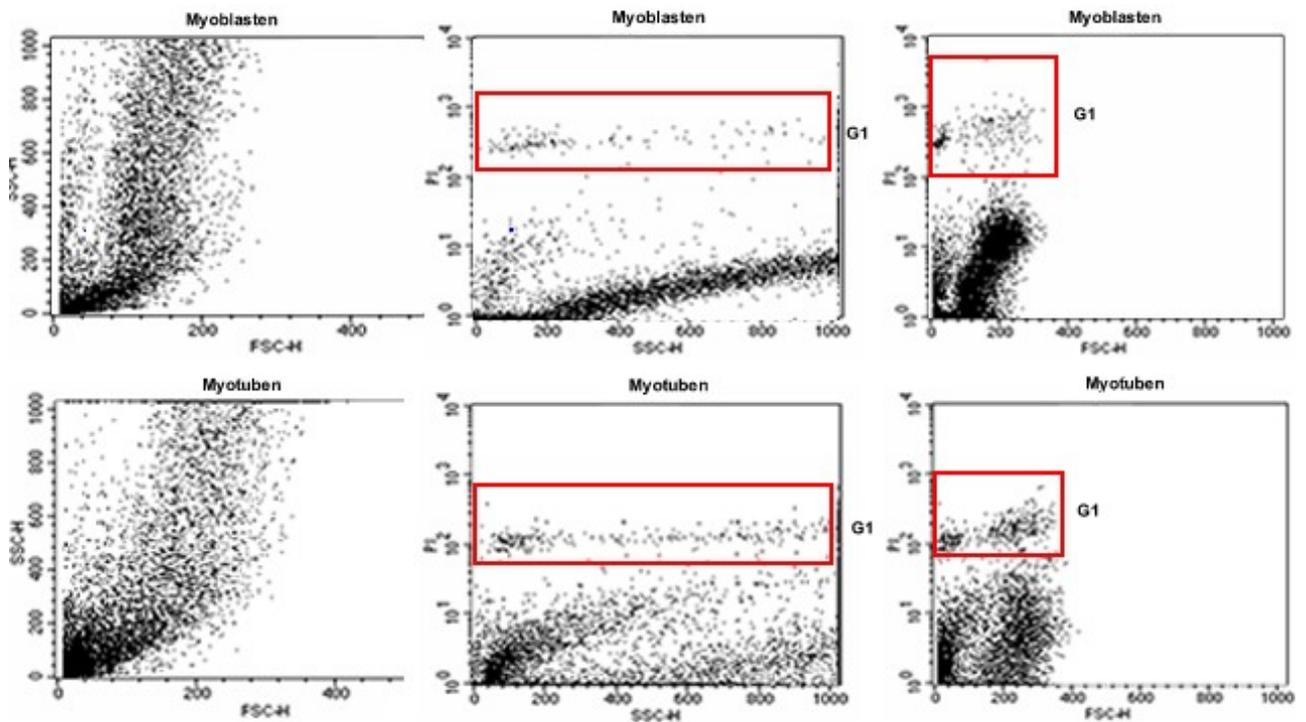
Darüber hinaus waren keine Unterschiede bei der Darstellung der Zellpopulationen im Forward-Sideward-Scatter oder im Fluoreszenz-Scatter-Plot von Zellen unterschiedlicher Patienten aber gleichen Zelltyps auszumachen (s. Abb. 3.2.1 B).

Unabhängig von der PI-Fluoreszenz als Zeichen der Vitalität der Zellen wurden in allen Scatter-Plots (Forward-Sideward, Forward-Fluoreszenz, Sideward-Fluoreszenz) drei distinkte Populationen abgebildet, die sich am deutlichsten in den Fluoreszenz-Scatter-Plots voneinander abgrenzen ließen. Die Subpopulation P1 wies bei mittlerer bis hoher Zellgröße im Forward-Scatter eine konstant geringe Granularität im Sideward-Scatter auf, während die Zellen der P2 bei hoher Zellgröße eine mittlere bis hohe Granularität zeigten. Die Zellen der Subpopulation P3 hingegen waren homogen klein mit unterschiedlich ausgeprägter Granularität (s. Abb. 3.2.1 B).

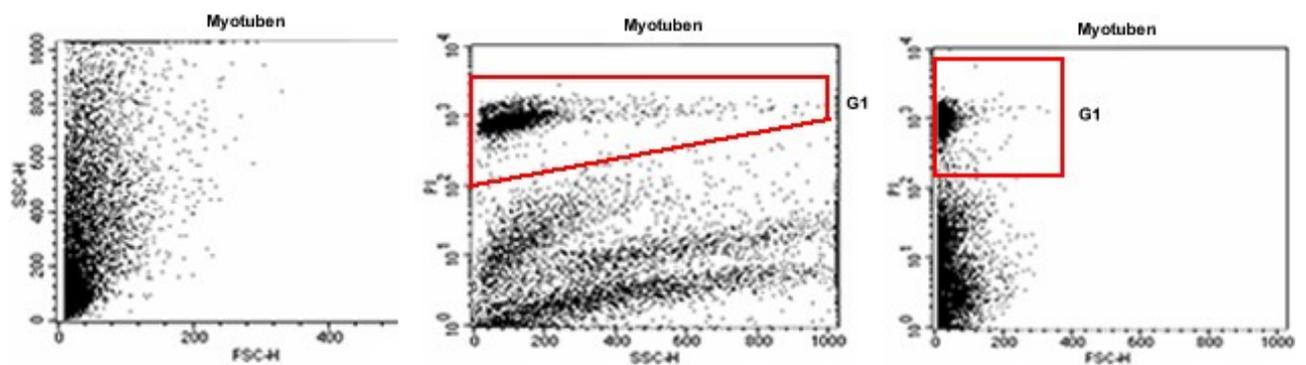
Die Einzelanalyse der Subpopulationen P1, P2 und P3 bezüglich des Anteils PI-positiver Ereignisse zeigte, dass geschädigte Zellen zwar in allen drei Subpopulationen zu finden waren, der allergrößte Teil jedoch in der P3-Population auftrat, welche damit den Hauptanteil toter Zellen an der Gesamtzellpopulation umfasste. Das bedeutet, dass mit zunehmender Zellschädigung der Probe die Subpopulationen zu einer einzelnen Zellpopulation zusammentraten, die analog zu P3 am unteren Ende des Forward-Scatters bei diffuser Sideward-Scatter-Streuung lag (siehe lysierte Zellen im Forward-Sideward-Scatter Abb. 3.2.1 A).

Normalkontrolle C.N.

nach Komplement-Behandlung
mit Propidiumiodid



lysierte Zellen (Aqua dest.)
mit Propidiumiodid



G1 - Population PI-positiver Zellen

Abb. 3.2.1 A: Populationen von Myoblasten und Myotuben im Zytometer

Im Forward-Sideward-Scatter (linkes Panel) stellen sich unter Komplementbehandlung (oben) bei Myoblasten und Myotuben drei distinkte Populationen dar, während nach vollständiger Lyse der Zellen unter Aqua dest. (unten) nur noch eine Population auszumachen ist. Die Zellpopulation mit signifikanter Fluoreszenz-Aufnahme im Fluoreszenz-Sideward-Scatter (mittleres Panel) und Fluoreszenz-Forward-Scatter (rechtes Panel) im Gate G1 nimmt im Vergleich zur Komplement-Behandlung unter Aqua dest.-Behandlung deutlich zu.

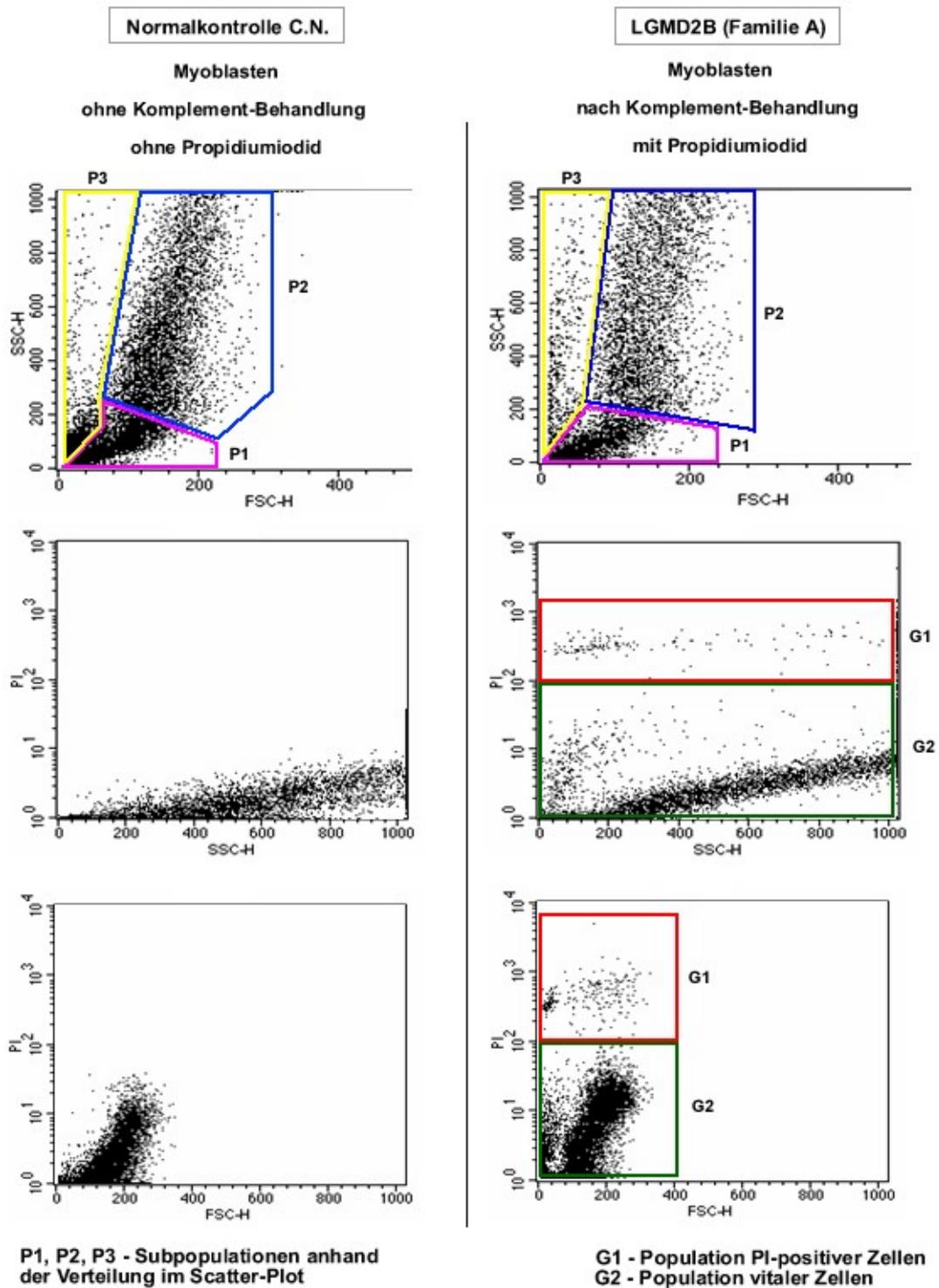


Abb. 3.2.1 B: Vergleich der Zellpopulationen von Myoblasten zwischen Normalkontrollen und LGMD2B-Familie A

Im Forward-Sideward-Scatter (obere Reihe) kann anhand der Populationen keine Unterscheidung zwischen Normalkontrollen und LGMD2B-Zellen gemacht werden: es stellen sich sowohl ohne als auch mit Komplement-Behandlung drei Populationen (P1, P2, P3) dar. Die im Gate G1 liegenden Zellen im Fluoreszenz-Sideward-Scatter (mittlere Reihe) und Fluoreszenz-Forward-Scatter (untere Reihe) stellen aufgrund der signifikanten PI-Aufnahme geschädigte Zellen dar.

3.2.2 Komplement-Assays in der Durchflusszytometrie

Die Quantifizierung Komplement-geschädigter Zellen konnte gemäß Abschnitt 2.1.6.5 am einfachsten im Fluoreszenzhistogramm erfolgen, wobei Gate 2 als Menge vitaler und Gate 1 als Menge toter Zellen definiert wurde (s. Abb. 3.2.2 A).

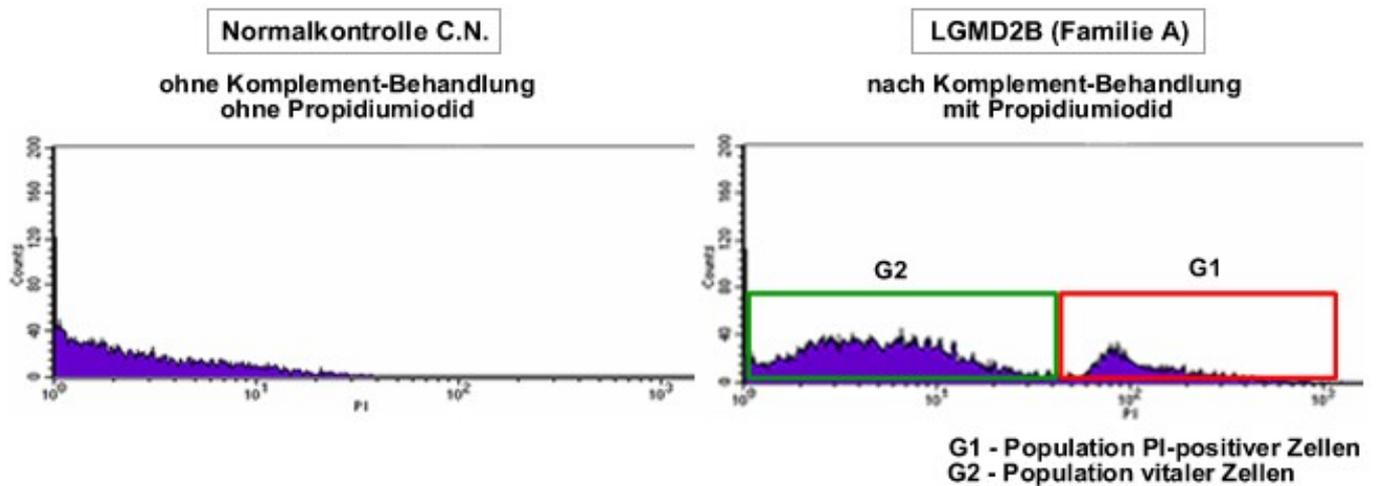


Abb. 3.2.2 A: Fluoreszenz-Histogramm zur quantitativen Analyse toter Zellen

Die Zahl der im Gate G1 auftretenden Events im Fluoreszenz-Histogramm, die aufgrund der signifikanten PI-Aufnahme geschädigte Zellen darstellen, wurde, auf 10.000 kumulative Events normiert, für unterschiedliche Behandlungen und Zelltypen verglichen.

Eine Übersicht der Mittelwerte und Standardabweichung PI-positiver Zellen gibt die Tab. 3.2.2 geordnet nach Mutation, Zelltyp und Behandlungsgruppen.

Tab. 3.2.2: Anteil PI-positiver Zellen je 10.000 Zellen [%]

Gruppe	Patient	Zelltyp	Kontrolle	VAP/BSA	NHS 1:20	NHS 1:10	NHS 1:5
Normal- kontrolle	C.N.	Blasten	8,86 ± 4,63	5,33 ± 4,04	5,24 ± 0,28	7,67 ± 0,57	6,89 ± 0,13
		Myotuben	9,45 ± 3,24	5,17 ± 0,86	7,46 ± 1,12	5,73 ± 0,75	4,05 ± 0,39
	K.S.	Blasten	16,97 ± 0,57		3,98 ± 0,11		2,45 ± 0,26
		Myotuben	14,88 ± 0,95		7,96 ± 0,67		4,18 ± 0,38
LGMD 2B	A	Blasten	4,11 ± 0,17			12,32 ± 2,06	
		Myotuben	8,83 ± 3,65	15,00 ± 3,18		18,63 ± 2,56	
	B	Blasten	19,24 ± 10,82	23,43 ± 7,10	18,43 ± 6,57	14,72 ± 5,00	13,26 ± 2,55
		Myotuben	16,70 ± 12,68	28,00 ± 18,82	14,21 ± 5,42	9,52 ± 3,34	6,25 ± 0,93
	C	Blasten	3,23 ± 0,49	7,18 ± 1,38		7,05 ± 0,07	

Für die Normalkontrollen ließ sich ähnlich wie bei der mikroskopischen Analyse eine weitgehende Resistenz sowohl der Myoblasten wie der Myotuben gegenüber Komplement feststellen (s. Abbildung 3.2.2 B).

Mit zunehmender Komplementkonzentration zeigte sich sogar ein sinkender Anteil PI-positiver Zellen. Dies war für beide Zelltypen der Fall, wobei der größte Anteil toter Zellen stets bei den unbehandelten Kontrollproben zu finden war. Das heißt, dass selbst unter der Komplement-Attacke mit der geringsten Komplementkonzentration noch weniger tote Zellen gemessen werden konnten als bei der unbehandelten Kontrollprobe (s. Abbildung 3.2.2 B und C).

Analog zu den Ergebnissen der Normalkontrollen wiesen die Myotuben aus der LGMD2B-Familie A einen deutlich größeren Anteil PI-positiver Zellen unter Komplementattacke im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe auf: hier kam es zu einem absoluten Anstieg um etwa 3% PI-positiver Zellen. (s. Abbildung 3.2.2 D).

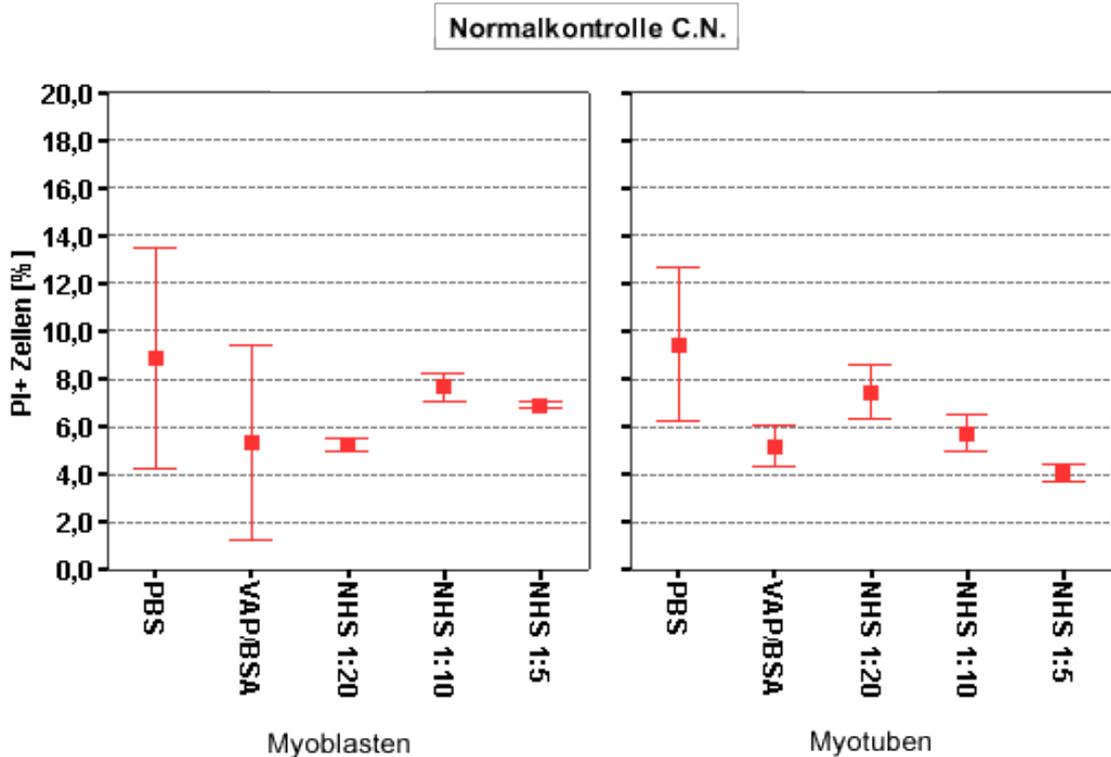


Abb. 3.2.2 B: FACS-Komplement-Assay von Myoblasten und Myotuben der Normalkontrolle C.N.

Prozentualer Anteil PI-positiver Myotuben unter Kontrollbehandlung (PBS sowie VAP/BSA) und ansteigenden Komplement-Konzentrationen (NHS): im Vergleich zur Kontrollbehandlung steigen die Werte PI-positiver Zellen mit zunehmender Komplementkonzentration weder für Myoblasten (linkes Panel) noch für Myotuben an (rechtes Panel), für Myotuben ist sogar eine Tendenz zur Reduktion geschädigter Zellen sichtbar.

Für die Myoblasten aus der LGMD2B-Familie B war entgegen den Ergebnissen aus der mikroskopischen Analyse keine Zunahme der PI-positiven Signale unter steigenden Komplementkonzentrationen nachweisbar (s. Abbildung 3.2.2 E).

Analog zu den Ergebnissen der Mikroskopie ergab sich bei der LGMD2B-Familie A jedoch eine deutlich nachweisbare Empfindlichkeit gegenüber Komplement, wobei die Rate toter Zellen von ca. 15 % unter VAP/BSA auf 18 % unter Komplementattacke um relativ 23 % stieg.

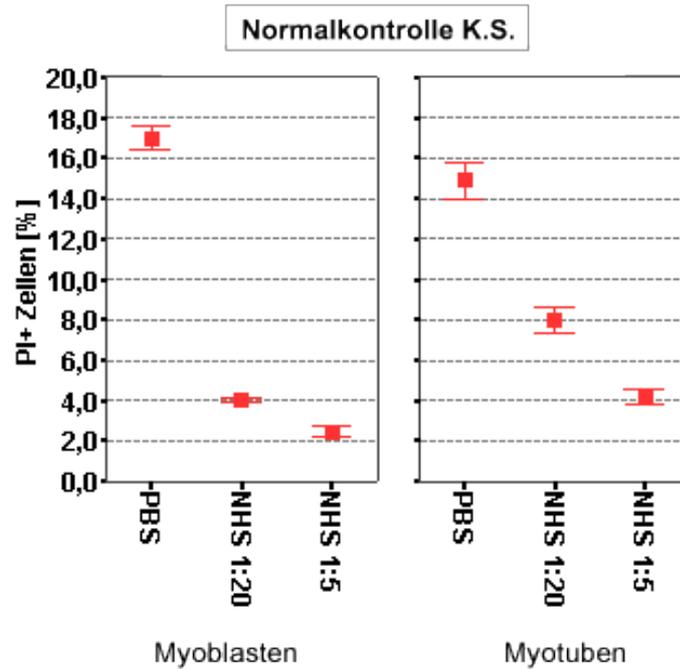


Abb. 3.2.2 C: FACS-Komplement-Assay von Myoblasten und Myotuben der Normalkontrolle K.S.

Prozentualer Anteil PI-positiver Myotuben unter Kontrollbehandlung (PBS) und ansteigenden Komplement-Konzentrationen (NHS): im Vergleich zur Kontrollbehandlung fallen die Werte PI-positiver Zellen mit zunehmender Komplementkonzentration sowohl bei Myoblasten (linkes Panel) als auch bei Myotuben ab (rechtes Panel).

Diese Beziehung war für die anderen LGMD2B-Familien nicht zu beobachten. Im Vergleich zur Kontrollprobe sank hier der Anteil der PI-positiven Zellen unter Komplementattacke (Familie B) bzw. blieb konstant (Familie C, s. Abbildung 3.2.2 F), ähnlich wie bei den Normalkontrollen.

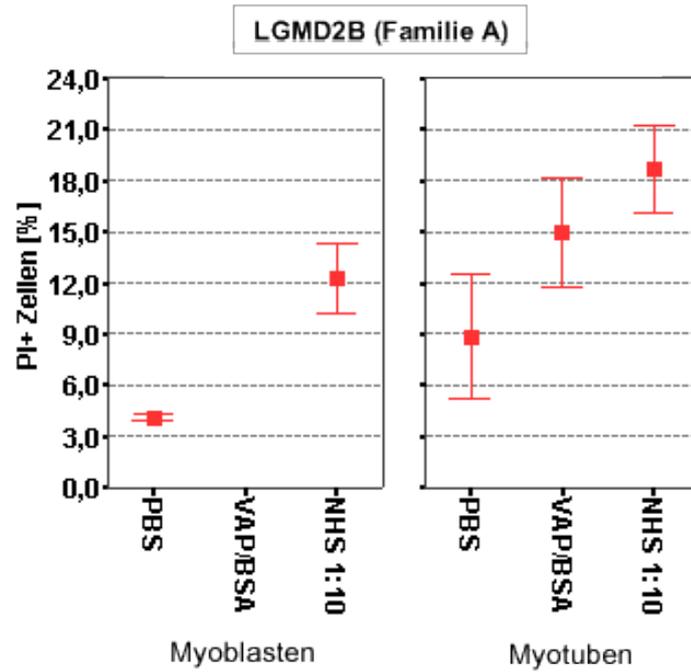


Abb. 3.2.2 D: FACS-Komplement-Assay von Myoblasten und Myotuben der LGMD2B-Familie A

Prozentualer Anteil PI-positiver Myotuben unter Kontrollbehandlung (PBS sowie VAP/BSA) und Komplement (NHS): im Vergleich zur Kontrollbehandlung liegen die Werte PI-positiver Zellen unter Komplement-Attacke sowohl bei Myoblasten (linkes Panel) als auch bei Myotuben (rechtes Panel) höher, bei den Myotuben um relativ 23% gegenüber der VAP/BSA-Behandlung.

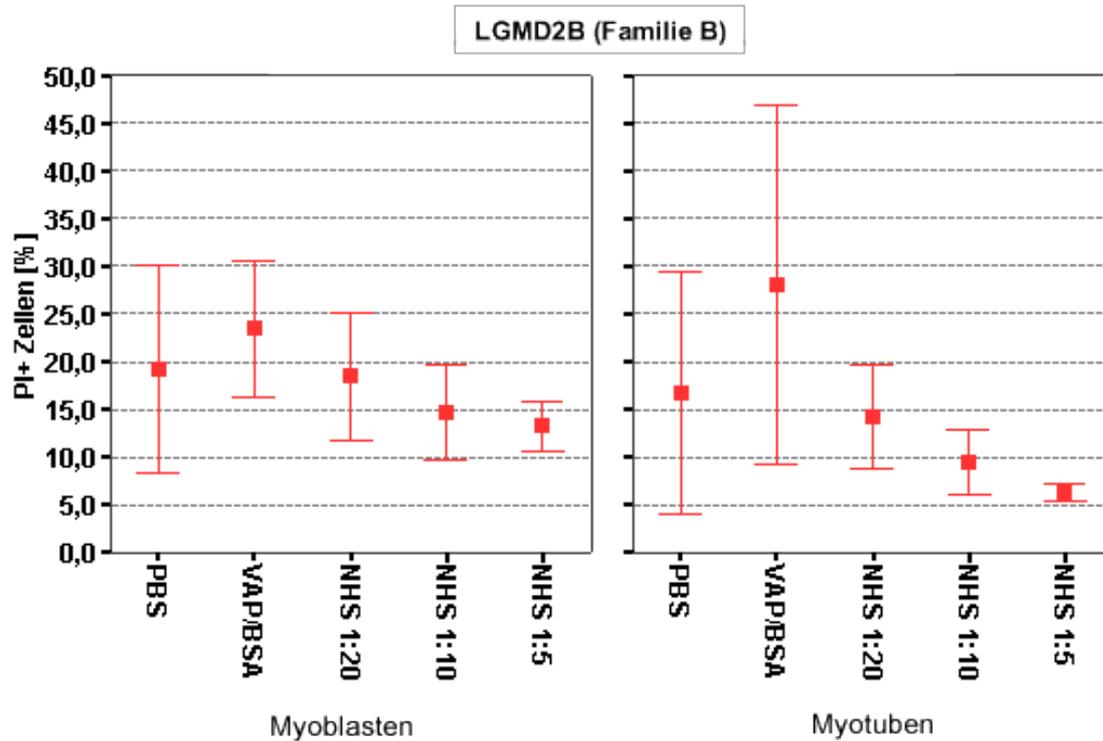


Abb. 3.2.2 E: FACS-Komplement-Assay von Myoblasten und Myotuben der LGMD2B-Familie B

Prozentualer Anteil PI-positiver Myotuben unter Kontrollbehandlung (PBS sowie VAP/BSA) und ansteigenden Komplement-Konzentrationen (NHS): im Vergleich zur Kontrollbehandlung steigen die Werte PI-positiver Zellen mit zunehmender Komplementkonzentration weder für Myoblasten (links) noch für Myotuben an (rechts), für beide Zelltypen ist sogar eine Tendenz zur Reduktion geschädigter Zellen sichtbar.

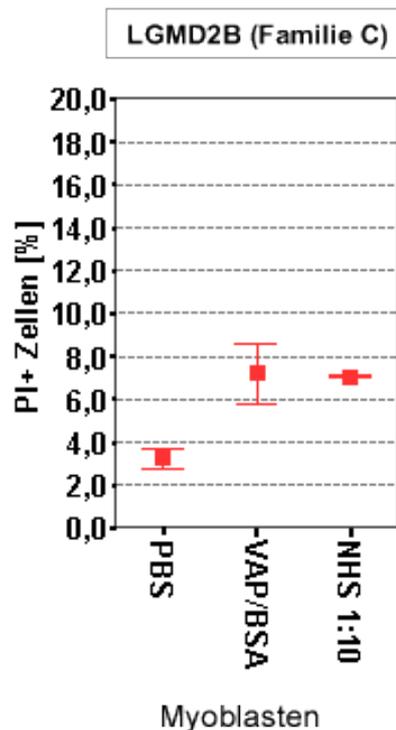


Abb. 3.2.2 F: FACS-Komplement-Assay von Myoblasten der LGMD2B-Familie C

Prozentualer Anteil PI-positiver Myotuben unter Kontrollbehandlung (PBS sowie VAP/BSA) und Komplement-Attacke (NHS): Kontrollbehandlung mit VAP/BSA und Komplement-Attacke verursachten ähnliche Werte PI-positiver Zellen.

3.3 Komplement-Blockade in vivo

3.3.1 Parameter der Muskeldystrophie

In der Voruntersuchung mit jeweils $n = 6$ Mäusen zeigte sich für alle Gruppen eine durchgehende dystrophe Muskelhistologie, in der alle beobachteten Parameter auffällige Befunde aufwiesen. Abbildung 3.3.1 A zeigt beispielhaft typische Befunde der Muskelbiopsien.

Der Gesamteindruck der einzelnen Biopate vermittelte zumeist einen deutlichen Unterschied zwischen stark betroffenen und weniger von Dystrophie betroffenen Tieren. Beispielhaft zeigt Abb. 3.3.1 B den Vergleich zwischen minimaler und deutlicher Dystrophie in der Histologie.

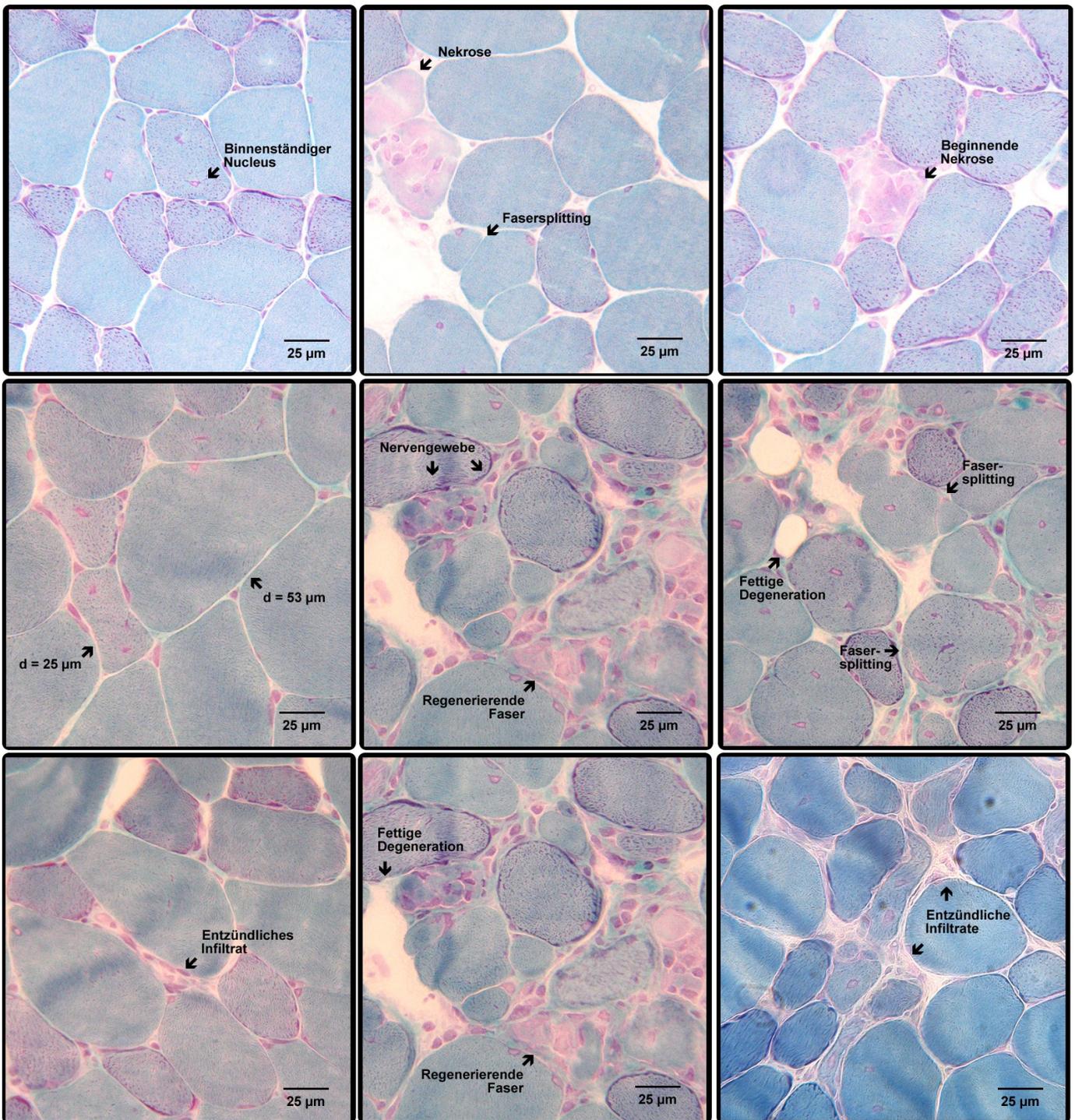


Abb. 3.3.1 A: Parameter der Muskeldystrophie im histologischen Bild von Muskelbiopaten in der SJL/J-Maus

Die neun Gesichtsfelder zeigen jeweils identische Vergrößerungen aus unterschiedlichen Biopaten der Versuchsreihe mit den typischen Darstellungen der Dystrophieparameter „Nekrose“, „binnenständige Nuclei“, „Fasersplitting“, „regenerierende Fasern“, „Entzündliche Infiltrate“, „Fettige Degeneration“, „minimaler und maximaler Faserdurchmesser“ (d).

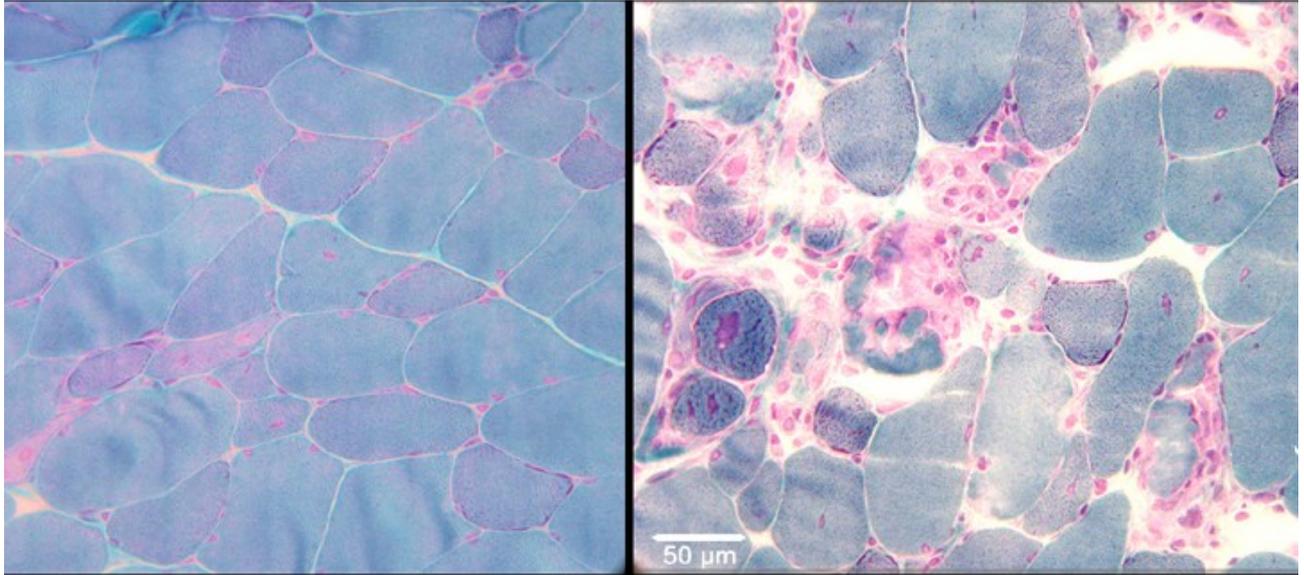


Abb. 3.3.1 B: Unterschiede im histologischen Gesamteindruck zwischen Präparaten mit unterschiedlichem Schweregrad der Dystrophie

Die Gesichtsfelder zeigen bei gleicher Vergrößerung links ein nur wenig von Dystrophie betroffenes Biopstat mit regelmäßiger Architektur, fehlenden entzündlichen Infiltraten, fettiger Atrophie oder Zellnekrosen sowie nur mäßiger Zahl an Fasersplittings und binnenständiger Nuclei. Auf der rechten Seite deutlich unruhige Architektur, zahlreiche Nekrosen und fettige Atrophie als Zeichen der schweren Dystrophie.

Für die Auswertung eigneten sich vor allem die Parameter „Nekrose“, „binnenständige Nuclei“, „Fasersplitting“ sowie „regenerierende Fasern“, da diese Elemente der einzelnen Faser eindeutig zuzuordnen sowie im Alles-oder-Nichts-Prinzip zählbar waren. Die Parameter „entzündliche Infiltration“ sowie fettige Degeneration waren nur semiquantitativ auswertbar, da ihr Vorkommen nicht auf einzelne Fasern bezogen werden konnte sowie durch die Ausbreitungsebenen im Präparat keine einzeln zählbaren Mengen darstellten. Die Parameter der Faserdurchmesser (und damit der rechnerisch ermittelten Durchmesserspannweite) nahmen eine Zwischenstellung ein, da sie für die einzelne Faser zwar eindeutig bestimmbar waren, die Auswahl der jeweils kleinsten bzw. größten Faser jedoch nach subjektivem Eindruck bei Durchsicht des Präparates erfolgte.

Tabelle 3.3 A zeigt Mittelwerte und Standardabweichung bzw. Verteilung aller Parameter im Überblick.

Tabelle 3.3 A: Histologische Parameter der Muskeldystrophie

[Mittelwert Standardabweichung] ±	Anti-C5- Antikörper N = 21	Isotyp- kontrolle N = 21	Albumin- kontrolle N = 6		
Nekrotische Fasern [%]	0,99 ± 0,93	1,6 ± 1,8	1,6 ± 0,3		
Binnenständige Nuclei [%]	13,0 ± 4,9	14,3 ± 6,8	13,1 ± 1,8		
Fasersplitting [%]	5,3 ± 2,7	6,5 ± 3,7	5,1 ± 0,8		
Regenerierende Fasern [%]	0,12 ± 0,09	0,10 ± 0,09	0,08 ± 0,07		
Entzündliche Infiltrate	[N]	[%]	[N]	[%]	
	-	2	9,5	2	9,5
	(-)	9	42,9	9	42,9
	+	6	28,6	8	38,1
	++	1	4,8	0	0
	+++	3	14,3	2	9,5
Fettige Degeneration	[N]	[%]	[N]	[%]	
	-	1	4,8	0	0
	(-)	5	23,8	5	23,8
	+	4	19,0	9	42,9
	++	6	28,6	3	14,3
	+++	5	23,8	4	19,0
Minimaler Durchmesser [µm]	20,3 ± 7,1	19,0 ± 5,9	12,1 ± 2,5		
Maximaler Durchmesser [µm]	99,6 ± 31,6	116,9 ± 81,2	78,3 ± 9,6		
Durchmesserspannweite [µm]	79,4 ± 30,6	97,9 ± 80,3	66,3 ± 9,3		

3.3.2 Gruppenunterschiede in den Dystrophieparametern

Die ausgeprägtesten Gruppenunterschiede traten bei den nekrotischen Fasern auf, die sich am seltensten bei den Anti-C5-Antikörper-behandelten Tieren zeigten (0,99 ± 0,93 %), während die Isotypkontrollen sowie die Albuminkontrollen vergleichbare Werte aufwiesen (1,6 ± 1,8 bzw. 1,6 ± 0,3 %) (s. Abbildung 3.3.2 A).

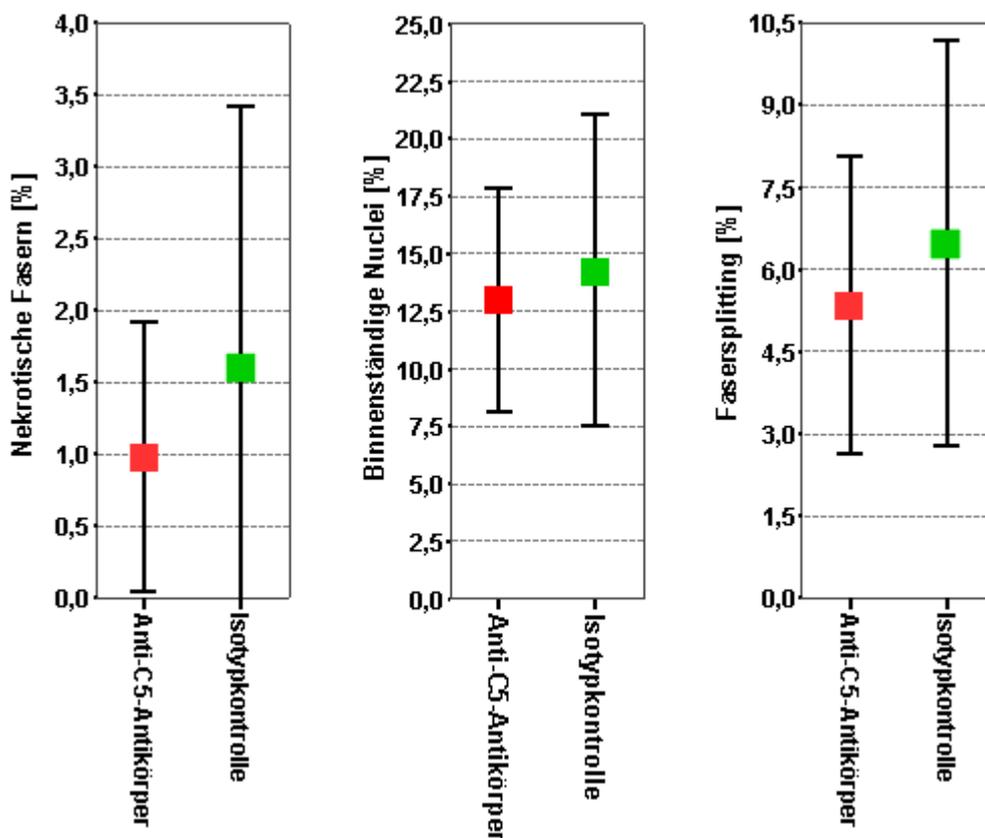


Abb. 3.3.2 A: Häufigkeit der Dystrophieparameter Nekrotische Fasern, Binnenständige Nuclei und Fasersplitting nach Behandlungsgruppen

Prozentualer Anteil von Muskelfasern mit den entsprechenden Dystrophieparametern je 100 Muskelfasern des Biopats. Alle drei Dystrophieparameter fanden sich weniger häufig in der anti-C5-Antikörper-behandelten Gruppe (rot) als bei der Isotypkontrolle (grün), der größte Unterschied war beim Parameter Nekrotische Fasern erkennbar.

Bei den binnenständigen Nuclei sowie bei der Zahl der Fasersplittings ergaben sich nur sehr geringe Unterschiede zwischen der Anti-C5-Antikörper-behandelten und der Albumin-behandelten Gruppe. In beiden Fällen wiesen Tiere der Isotypkontrolle leicht höhere Werte auf als diejenigen der Anti-C5-Antikörper-behandelten: für binnenständige Nuclei $14,3 \pm 6,8$ bzw. $13,0 \pm 4,9$ % und für Fasersplitting $6,5 \pm 3,7$ bzw. $5,3 \pm 2,7$ % (s. Abbildung 3.3.2 A).

Der Anteil regenerierender Fasern nahm von der Albumin-Kontrolle über die Isotypkontrolle bis zur anti-C5-Antikörper-Behandlung zu, was offenbar mit der Abnahme nekrotischer Fasern im Präparat korrespondierte.

Sowohl für die Parameter Entzündliche Infiltrate als auch Fettige Degeneration galt, dass

mehr Bioplate mit ausgeprägten Veränderungen in der Gruppe der Anti-C5-Antikörper-behandelten Tiere vorkamen, während die Bioplate mit weniger ausgeprägten Veränderungen häufiger bei der Isotypkontrolle auftraten (s. Abbildung 3.3.2 B).

Bezüglich der Faserdurchmesser ergaben sich die kleinsten Werte sowohl für den minimalen, als auch für den maximalen Durchmesser bei den Albuminkontrollen ($12,1 \pm 2,5$ bzw. $78,3 \pm 9,6 \mu\text{m}$). Während die Minimaldurchmesser der Anti-C5-Antikörper-Behandlung und der Isotypkontrolle vergleichbar waren ($20,3 \pm 7,1$ bzw. $19,0 \pm 5,9 \mu\text{m}$), zeigte sich ein deutlich größerer Maximaldurchmesser bei Tieren der Isotypkontrolle ($116,9 \pm 81,2$ gegenüber $99,6 \pm 31,6 \mu\text{m}$ bei der Anti-C5-Antikörper-Behandlung).

Somit waren auch die Durchmesserspannweiten der Isotypkontrolle höher als diejenigen der Anti-C5-Antikörper-Behandlung ($97,9 \pm 80,3$ bzw. $79,4 \pm 30,6 \mu\text{m}$) (s. Abbildung 3.3.2 C).

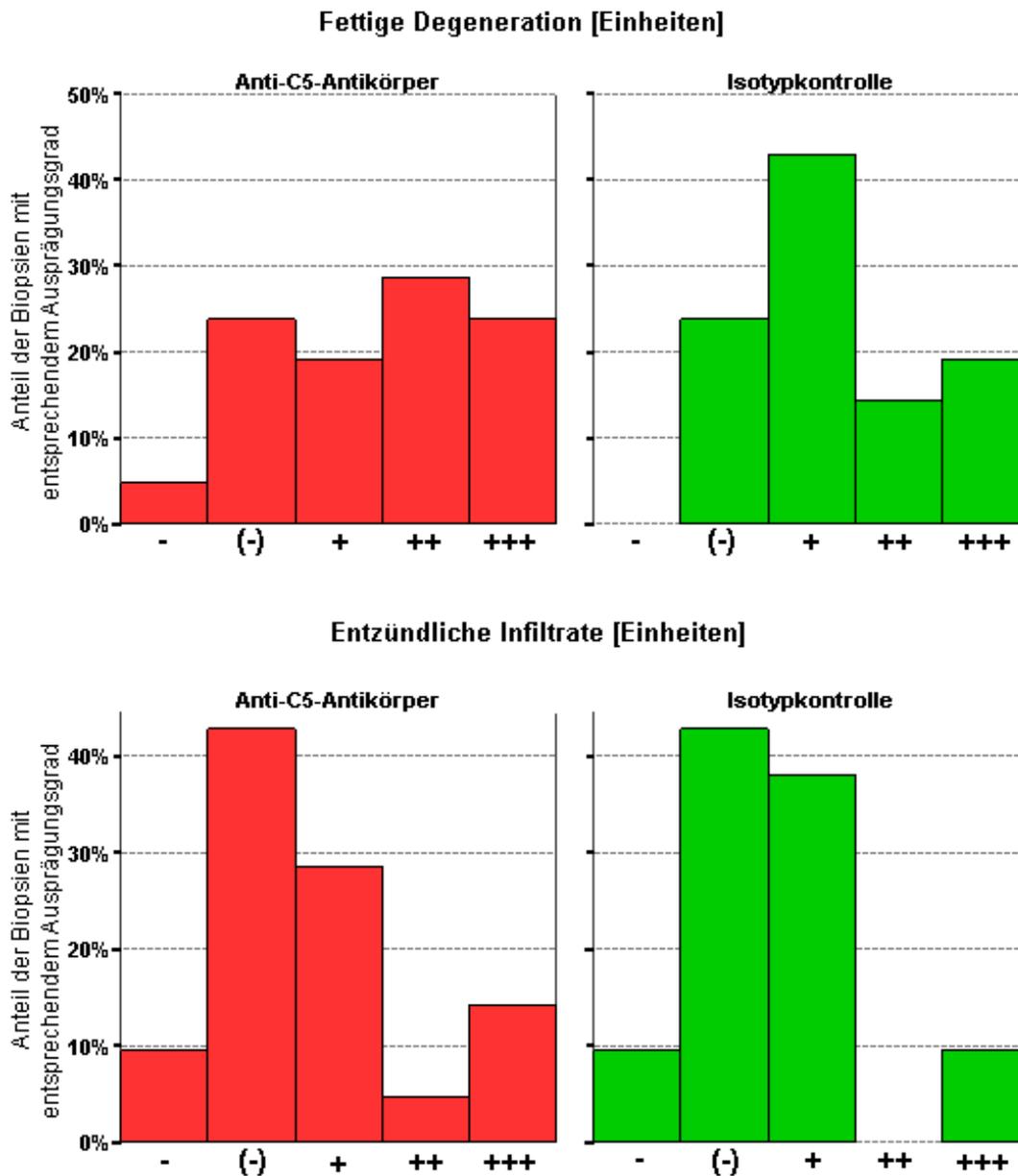


Abb. 3.3.2 B: Häufigkeit der Dystrophieparameter fettige Degeneration und entzündliche Infiltrate nach Behandlungsgruppen

Semiquantitative Analyse der Dystrophieparameter fettige Degeneration (oberes Panel) und entzündliche Infiltrate (unteres Panel) in den fünf Ausprägungsgraden „-“ (nicht vorhanden) bis „+++“ (am stärksten vorhanden). Balken geben den prozentualen Anteil der Biopsien mit dem entsprechenden Ausprägungsgrad an allen Biopstaten wider. Es lassen sich keine deutlichen Unterschiede zwischen der anti-C5-Antikörper-behandelten Gruppe (rot) und der Isotypkontrolle (grün) ausmachen.

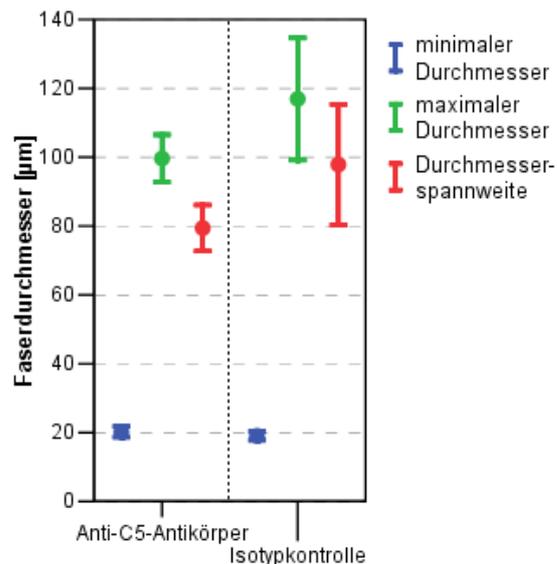


Abb. 3.3.2 C: Verteilung des Dystrophieparameters Faserdurchmesser nach Behandlungsgruppen

Verteilung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Faserdurchmesser aller Biopate einer Behandlungsgruppe für die Messung von minimalem (blau) und maximalem Faserdurchmesser (grün) sowie deren arithmetischer Mittelwerte, der Durchmesserspannweite (rot). In der anti-C5-Antikörper-behandelten Gruppe (linke Seite) trat aufgrund niedrigerer maximaler Faserdurchmesser auch eine geringere Durchmesserspannweite auf als bei der Isotypkontrolle (rechte Seite).

Keiner der genannten Gruppenunterschiede war jedoch so ausgeprägt, dass ein statistisch signifikanter Unterschied bei der allgemeinen Datenanalyse zu ermitteln war. Da jedoch unter Sicht des Auges eindeutig Unterschiede in den Muskelbiopsien zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppen vorlagen (s. Abb. 3.3.1 B), wurden die Daten zusätzlich anhand der sog. Effektstärke überprüft.

3.3.3 Effekt der Behandlung auf die Muskelfasernekrosen

Insgesamt erwies sich die Nekrose als stabilster Analyseparameter der Muskeldystrophie, sowohl aufgrund der guten Auswertbarkeit des Parameters als auch wegen der aus der von Voruntersuchungen bekannten Dynamik der Nekrosenentwicklung, woraus sich der spontane Dystrophieprogress ableiten lässt.

Die Effektstärken berechnen sich für die verschiedenen histologischen Parameter auf die in Tabelle 3.3 B gegebenen Werte.

Tabelle 3.3 B: Behandlungseffekte auf verschiedene histologische Parameter

Histolog. Parameter	Prüfbehandlung	Kontrollbehandlung	Effektstärke d_u	Bewertung	Signifikanz
Nekrosen	Anti-C5-Ak	Isotyp-Ak	-0,60	mittel protektiv	P < 0,05
	Anti-C5-Ak	Albumin	-4,13	hoch protektiv	P < 0,001
	Isotyp-Ak	Albumin	-1,13	hoch protektiv	P < 0,01
Binnenständige Nuclei	Anti-C5-Ak	Isotyp-Ak	-0,04	ohne Effekt	n.s.
	Anti-C5-Ak	Albumin	-0,01	ohne Effekt	n.s.
	Isotyp-Ak	Albumin	0,05	ohne Effekt	n.s.
Fasersplitting	Anti-C5-Ak	Isotyp-Ak	-0,11	ohne Effekt	n.s.
	Anti-C5-Ak	Albumin	-1,45	hoch protektiv	P < 0,001
	Isotyp-Ak	Albumin	0,19	ohne Effekt	n.s.
Minimaler Durchmesser	Anti-C5-Ak	Isotyp-Ak	0,03	ohne Effekt	n.s.
	Anti-C5-Ak	Albumin	0,27	ohne Effekt	n.s.
	Isotyp-Ak	Albumin	0,35	ohne Effekt	n.s.
Maximaler Durchmesser	Anti-C5-Ak	Isotyp-Ak	-0,005	ohne Effekt	n.s.
	Anti-C5-Ak	Albumin	0,17	ohne Effekt	n.s.
	Isotyp-Ak	Albumin	0,012	ohne Effekt	n.s.
Durchmesser-spannweite	Anti-C5-Ak	Isotyp-Ak	-0,005	ohne Effekt	n.s.
	Anti-C5-Ak	Albumin	0,14	ohne Effekt	n.s.
	Isotyp-Ak	Albumin	0,01	ohne Effekt	n.s.

n.s. – nicht signifikant

Ein protektiver Effekt auf die Entwicklung von Nekrosen ergibt sich hiernach sowohl für die Anti-C5-Antikörper-Behandlung gegenüber beiden Kontrollgruppen als auch für die Isotypbehandlung gegenüber der Albuminkontrolle. Dies bedeutet, dass der spontane Progress (Verschlechterung) der Muskelhistologie, der sich aufgrund der fortschreitenden Dystrophie einstellt, durch die Behandlung vermindert wird. Die Effektivität der Behandlung nimmt im Falle der Nekrosen offensichtlich auch mit zunehmender Spezifität ihres Angriffspunktes zu.

Ein hochprotektiver Effekt war bezüglich der Entwicklung von Fasersplittings ebenfalls durch

die Behandlung mit Anti-C5-Antikörpern gegenüber Albumin-Kontrollen zu verzeichnen. Da gleichzeitig jedoch kein Behandlungseffekt gegenüber der Isotypkontrolle bzw. durch die Isotyp-Kontrolle gegenüber der Albumin-Kontrolle auftrat, muss von einer differentiellen Wirkungsweise des spezifischen Antikörpers ausgegangen werden, welche sich hierfür nicht bei den unspezifischen Antikörpern zeigt.

Bezüglich der übrigen histologischen Parameter traten keine Behandlungseffekte durch spezifische oder unspezifische Antikörperbehandlung gegenüber den Kontrollgruppen auf.

3.3.4 Analyse der Muskelfasernekrosen

Da somit ein Behandlungseffekt auf die spontane Entwicklung der Nekrosen nachweisbar ist, muss die Ursache der bei der allgemeinen statistischen Analyse geringen Gruppenunterschiede in der heterogenen Dynamik der Muskeldystrophie der einzelnen Tieren liegen.

Aufgrund dessen wurden die Biopsiedaten der einzelnen Tiere zusammengefasst und anhand des Schweregrads der Nekrosen in zwei Gruppen unterteilt: biopsische Präparate, die weniger als 1% Nekrosen aufwiesen, wurden als „normal“ definiert, während Präparate mit 1% oder mehr nekrotischen Fasern als „beeinträchtigt“ eingestuft wurden. Diese Zuordnung charakterisiert die zunächst moderate „Grundaktivität“ der Krankheit im Jugendalter der Mäuse sowie die darauf folgende, sprunghafte Ausdehnung histologischer Dystrophiezeichen im mittleren Alter als deutlichen „Krankheitsschub“. So treten bis zum Alter von ca. 20-24 Wochen regelhaft Nekrosen von bis zu 1 % auf, anschließend steigt dieser Anteil stark an. Durch die so erfolgte Einteilung der Gruppen wurde eine Normierung der zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns eingetretenen dystrophischen Zeichen vorgenommen, mit dem Ziel, einen Behandlungseffekt bei kleiner Behandlungsgruppe zu demaskieren.

Wie Tabelle 3.3 C zeigt, war die Zahl der Biopsien aus der Kategorie „normaler Muskel“ in der Gruppe der mit Anti-C5-Antikörper behandelten Tiere am höchsten, während in der Isotyp-Kontrolle deutlich weniger und in der Albumin-Kontrolle keine Biopsien der Kategorie „normaler Muskel“ vorkamen. Die Zahl der Biopsien aus der Kategorie „beeinträchtiger Muskel“ hingegen war in der Albumin-Kontrolle am höchsten, während in der Isotypkontrolle weniger als 2/3 und in der Anti-C5-Antikörper-Behandlung nur knapp 1/3 der Biopsien „beeinträchtigen Muskel“ zeigten.

Tabelle 3.3. C: Verteilung der bioptischen Präparate nach Normierung der Dystrophie-Dynamik auf die Behandlungsgruppen

	Anti-C5-Antikörper		Isotyp-Kontrolle		Albumin-Kontrolle	
	N = 21		N = 21		N = 6	
Kategorie	N	%	N	%	N	%
Normaler Muskel	13	62	9	43	0	0
Beeinträchtiger Muskel	8	38	12	57	6	100

Der Gruppenunterschied zwischen der Anti-C5-Antikörper-Behandlung und der Albuminkontrolle ist auf dem Niveau $P < 0,01$ statistisch signifikant, wodurch die protektive Wirkung der Anti-C5-Antikörper-Behandlung auf die spontane Entwicklung von Muskelfasernekrosen deutlich wird. Auch wenn Abbildung 3.3.5 einen deutlichen Unterschied zwischen der Albuminkontrolle und der Isotypkontrolle zeigt, war eine statistische Signifikanz nicht nachzuweisen, was offenbar an der geringen Fallzahl der Albuminkontrolle in Verbindung mit dem geringer ausgeprägten Behandlungseffekt der Isotypkontrolle lag.

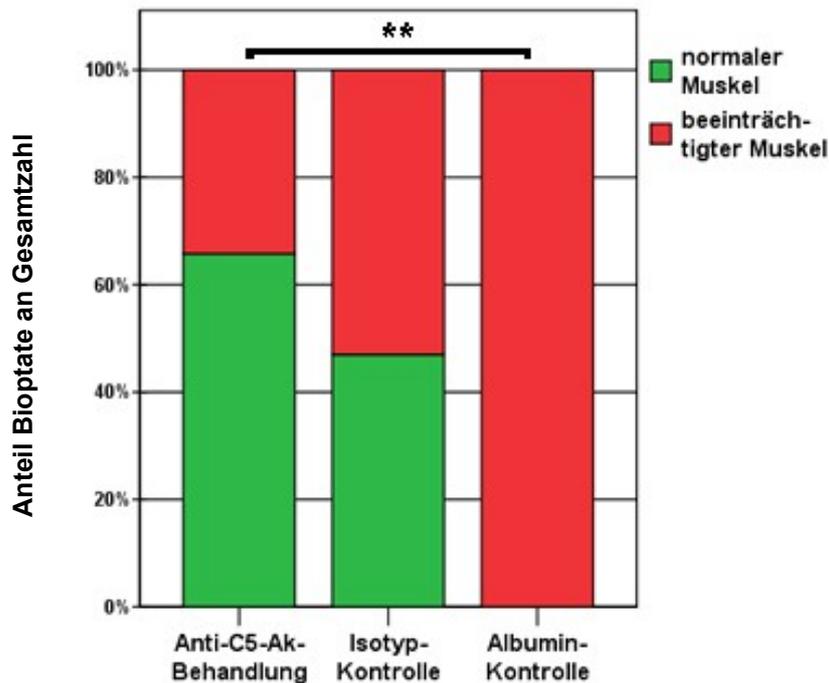


Abb. 3.3.5: Häufigkeitsverteilung der Biopiate nach Normierung der Dystrophie-Dynamik

In den drei Behandlungsgruppen Anti-C5-Antikörper-Behandlung (links), Isotypkontrolle (Mitte) und Albuminkontrolle (rechts) zeigen sich unterschiedliche Häufigkeiten an Biopsien, die nach „normalem Muskel“ (grün) oder „beeinträchtigtem Muskel“ (rot) normiert wurden. Der Unterschied zwischen der Anti-C5-Antikörper-Behandlung, welche zu zwei Dritteln Biopiate mit „normalen“ Veränderungen aufweist, und der Albuminkontrolle, welche zu 100 % Biopiate aus „beeinträchtigter Muskulatur“ zeigt, ist auf dem Niveau $P < 0,01$ signifikant.

4 Diskussion

4.1 Myoblasten von LGMD2B-Patienten reagieren empfindlicher auf Komplement-Angriffe als Normalkontrollen

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass Myoblasten *in vitro* unabhängig von einer etwaigen zugrunde liegenden Muskelerkrankung sowohl von steigenden Komplementkonzentration als auch von steigender Komplementeinwirkzeit in zunehmender Zahl geschädigt werden (s. Abb. 3.1.2 A). Dies wird auch von Gasque et. al. sowohl für adhärenzte als auch für Zellen in Suspension beschrieben, wobei betont wird, dass dies ohne

Inhibition von Komplementschutzfaktoren nur in minimaler Ausprägung vorkomme⁴³. Obwohl absolute Zahlen nicht genannt werden, lässt sich aus der Abbildung ein Anstieg der Zahl geschädigter Zellen von etwa 5% (ohne Komplement) über etwa 8% (Komplementkonzentration = NHS 1:16) bis etwa 12% (NHS 1:4) bei 30-minütiger Inkubationszeit ablesen. Diese Zahlen werden durch die vorliegende Studie für das Normalkollektiv bestätigt. Der fehlende Anstieg der Zahl toter LGMD2B-Myoblasten über zunehmende Komplementkonzentrationen hinweg in LGMD2B-Myoblasten ist sehr wahrscheinlich experimentell bedingt (s. Abb. 3.1.2 A): Hier ist analog zu den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Untersuchung von einem sehr viel höheren Anteil an vollständig lysierten Zellen auszugehen, deren Fragmente in den folgenden Waschvorgängen aus der Zählkammer herausgelöst wurden, so dass die Zahl PI-aufnehmender Zellen artifiziell niedrig ausfällt. Da dies eine deutlich höhere Empfindlichkeit von LGMD2B-Myoblasten gegenüber Komplement insinuiert, wurde in einem durchflusszytometrischen Setting der Nachweis dieser Theorie versucht.

Es zeigte sich jedoch auch unter diesen Bedingungen keine Zunahme der Zahl PI-aufnehmender Zellen unter Intensivierung der Komplementattacke (s. Abb. 3.2.2 E). Darüber hinaus war in der Durchflusszytometrie auch keine zunehmende Zellschädigung von Myotuben unter zunehmender Komplementattacke zu beobachten (s. Abb. 3.2.2 B, C). Da Gasque et al. die oben beschriebenen Ergebnisse der Mikroskopie auf die Durchflusszytometrie mit analogen Ergebnissen übertragen konnten⁴³, ist in der vorliegenden Untersuchungen von experimentellen Unterschieden auszugehen, die entweder zur vollständigen Lyse der Zellen vor der Zellzahlbestimmung im FACS-Gerät führen, so dass kein PI-Signal einem Zellzahlsignal im entsprechenden Detektorfenster zuzuordnen ist. Darüber hinaus ist bei fehlenden Zellgrenzen nach vollständiger Lyse auch die Inkorporation und damit die räumliche Lokalisation des Propidiumiodids innerhalb der Zelle nur eingeschränkt gegeben. Durch die somit fehlende Akkumulation des Farbstoffs in diskreten Rauminhalten könnte die Signalintensität vermindert und eine falsch niedrige Fluoreszenz (bei gleich bleibender Gesamtfluoreszenz) gemessen werden. Andererseits besteht im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Mikroskopie die Möglichkeit eines protektiven Effektes des Komplementpuffers, der für die Durchflusszytometrie verwendet wurde, da bereits durch alleinige Behandlung mit dem VAP/BSA-Puffer die PI-positiven Zellzahlen im Vergleich zur Kontrollprobe gesenkt wurden. Da der VAP/BSA-Puffer die Grundlage für den Komplementzusatz darstellte, könnten die Zellen bei der experimentellen Handhabung

unabhängig von der Komplement-Attacke geschützt worden sein.

4.2 Myotuben von LGMD2B-Patienten reagieren empfindlicher auf Komplement-Angriffe als Normalkontrollen

Analog zu den Myoblasten kann die vorliegende mikroskopische Untersuchung auch für Myotuben eine Schädigung durch Komplement sowohl bei Normalkontrollen als auch bei LGMD2B-Patienten zeigen (s. Abb. 3.1.2 B, C). Eine zunehmende Schädigung von Myotuben unter zunehmender Intensität der Komplement-Attacke ließ sich jedoch nur bei der LGMD2B-Mutation zeigen (s. Abb. 3.1.2 C), denn die Zellen der Normalkontrollen nahmen weitgehend unabhängig von einer Eskalation der Komplementeinwirkung PI auf (s. Abb. 3.1.2 B). Wie Gasque et al. gezeigt haben, verlieren Myotuben die Fähigkeit zur Exprimierung bestimmter komplement-protektiver Faktoren⁴³. Unter dieser Voraussetzung wäre eine deutlich steigende Empfindlichkeit gegenüber der Komplementattacke von Myotuben im Vergleich zu Myoblasten zu erwarten. Dass in der vorliegenden mikroskopischen Untersuchung die gesunden Myotuben in absoluten Zahlen eine deutlich niedrigere Rate an PI-positiven Zellen nach Komplementattacke als die gesunden Myoblasten aufwiesen (vgl. Abb. 3.1.2 A und Abb. 3.1.2 B), ist auch hier am ehesten mit einer artifiziellen Reduktion der Gesamtzahl der Zellen durch vollständige Lyse zu erklären. Dies wiederum zeigt die besondere Empfindlichkeit der Myotuben bei der experimentellen Handhabung sowie die schwierige Aufgabe, in zukünftigen Untersuchungen zwischen Myoblasten und Myotuben vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

In diesem Zusammenhang weniger interessant sind also die absoluten Zahlen geschädigter Zellen unter Myotuben, sondern ein Vergleich der relativen Zunahme PI-positiver Zellen unter Komplementattacke gegenüber Kontrollbedingungen (s. Abschnitt 4.3).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchung ergibt die Analyse der durchflusszytometrischen Daten kein klares Bild über die Zellschädigung durch Komplement-Attacke. Für die Normalkontrollen ergibt sich sowohl für Myoblasten auch für Myotuben entweder eine fehlende Zunahme PI-positiver Signale mit steigender Komplementkonzentration (s. Abb. 3.2.2. B) oder sogar eine Abnahme (s. Abb. 3.2.2 C) der Zahl geschädigter Zellen. Eine deutliche Zellschädigung bei LGMD2B-Zellen unter Komplement-Attacke kann das verwendete FACS-Protokoll nur für die LGMD2B-Familie A zeigen (s. Abb. 3.2.2 D), während auch für die Zellen der Familien B (s. Abb. 3.2.2 E) und C

(s. Abb. 3.2.2 F) kein deutliches komplement-abhängiges Schädigungsmuster nachweisbar ist. Allerdings vollzieht dieses Ergebnis den Befund aus der mikroskopischen Untersuchung nach, in welcher Zellen der Familie A ebenfalls am empfindlichsten auf die Komplement-Attacke reagierten (s. Abb. 3.1.2 D).

Warum keine aussagekräftige Übertragung der mikroskopischen Untersuchung auf die FACS-Analyse gelang, ist unklar. Dieses ist jedoch am ehesten als technische Limitation im Experiment zu werten, da sich Myotuben und Myoblasten in der Durchflusszytometrie nicht klar als Population voneinander abgrenzen ließen. Während eine Durchmischung der Probe mit Zellen verschiedener Patienten experimentell ausgeschlossen werden kann, besteht in einer Primärkultur von Myoblasten stets die Möglichkeit einer spontanen Differenzierung zu Myotuben. Diese steigt mit zunehmender Zahl von Passagen sowie unter bestimmten Kulturbedingungen (s. Abschnitt 1.4), und lassen sich nicht grundsätzlich ausschließen. Im vorliegenden Experiment wurden Myoblasten mit einer Passagezahl unter 12 und einer Gesamtkultivierungsdauer von unter 4 Wochen verwendet. Innerhalb dieser Zeitspanne war mikroskopisch keine signifikante Spontandifferenzierung zu beobachten. Dennoch könnten möglicherweise in durchflusszytometrischen Proben von Myoblasten auch Myotuben vorhanden sein.

Deren Ausschluss bzw. Nachweis wäre durch zukünftige Messung verschiedener Oberflächenmarker möglich, die mittels Antikörper markiert werden können. Auf diese Weise ließe sich auch eine Differenzierung des Zelltyps anhand der Scatter-Morphologie in Folgeuntersuchungen charakterisieren.

4.3 Komplement-vermittelte Zellschädigung erklärt das klinische Bild von Gliedergürteldystrophien

Mittels des Vergleiches der relativen Zunahme PI-positiver Zellen unter Komplementattacke gegenüber Kontrollbedingungen wurden die Empfindlichkeiten der Myotuben gegenüber Komplement normiert, so dass ein Vergleich zwischen Zellen unterschiedlicher Mutationen möglich war. Die vorliegende Untersuchung zeigt erstmals, dass Myotuben von LGMD2B-Patienten eine 2- bis 4-fach erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Komplement-Angriff aufweisen (s. Abb. 3.1.2 D). Diese Situation zeigt einen plausiblen Pathomechanismus auf, der unabhängig von dem bisher diskutierten Membranreparatur-Defizit bei Dysferlinopathien^{16,19} abläuft. Während regulär vorkommenden Mikrotraumata der Muskulatur

käme es demnach zu einer physiologischen Aktivierung des Komplementsystems, welches die Muskelvorläuferzellen schädigt, die eigentlich die adäquate Regeneration der Läsion besorgen sollten. Hierdurch käme es zu einem fehlenden Wiederaufbau des Muskels, welcher in der Folge an Substanz verlieren und somit paretisch würde. Ebenso wie die Theorie des Membranreparatur-Defizits kann der vorgelegte Pathomechanismus erklären, warum zunächst die Muskelentwicklung durch die Dysferlindefizienz nicht beeinträchtigt wird, eine Beeinträchtigung des Muskels jedoch durch jahrelangen Gebrauch bei physiologischen (Mikro-)Traumata ab dem zweiten oder dritten Lebensjahrzehnt auftritt⁹. Aus der vorliegenden Studie ließe sich zusätzlich die Entwicklung von Atrophien des Muskels durch kontinuierliche Reduktion des Pools an Muskelvorläuferzellen erklären. Eine solche Abnahme von Muskelsubstanz könnte auch durch den Abbau von membrangeschädigten Muskelfasern und Ersatz durch Muskelvorläuferzellen erklärt werden, deren Menge begrenzt ist und somit über die Zeit ebenso kein Ausgleich mehr möglich ist. Das denkbare Zusammentreffen dieser beiden Situationen, der Depletion von Muskelvorläuferzellen durch Schädigung der Zellen selbst sowie deren Konsumption durch hohe Umbauraten, unterstreicht dann das dynamische Geschehen der Pathologie von Dysferlinopathien, welches neben der bisher üblichen strukturellen Betrachtungsweise zukünftig auch eine auf den Metabolismus des Muskels ausgerichtete Denkart erfordern würde.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Empfindlichkeit der Myotuben gegenüber Komplement auch zwischen unterschiedlichen LGMD2B-Mutationen variiert: am stärksten sind demnach Myotuben der Mutation aus Familie A, am wenigstens jene aus der Familie C-Mutation betroffen. Aufgrund der beschriebenen Rolle von Myotuben als Vorläuferzellen bei der Muskelregeneration wäre diesbezüglich mit unterschiedlich ausgeprägten klinischen Symptomen der einzelnen Patienten zu rechnen. Der klinische Verlauf ist diesbezüglich weiter abzuwarten.

4.4 LGMD2B-Patienten weisen funktionell sowohl eine CD55- als auch eine CD59-Defizienz auf

Gasque et al. beschreiben als Voraussetzung für eine Schädigung gesunder Myoblasten durch Komplement die Ausschaltung des Komplement-Inhibitors CD59. Die Blockade von CD55 hingegen bewirkte nicht für sich allein, sondern nur unter zusätzlicher Ausschaltung von CD59 eine Schädigung von Myoblasten⁴³.

Erwartungsgemäß zeigt in der vorliegenden Studie die Blockade von CD55 bei Myoblasten von LGMD2B-Patienten aufgrund der bekannten CD55-Defizienz keinen statistisch signifikanten Effekt (s. Abb. 3.1.2 E). Überraschenderweise bleibt jedoch auch ein deutlicher toxischer Effekt auf Myoblasten der Typ C-Mutation bei Blockade des Komplement-Inhibitors CD59 aus (s. Abb. 3.1.2 E). Dies weist darauf hin, dass auch die CD59-Funktion in Dysferlinopathien beeinträchtigt ist. Möglicherweise unterliegt auch die CD59-Regulation der Regulation des SMAD-Protein-Pfades, so dass die potentiell gemeinsame Endstrecke der Dysferlindefizienz sowohl die Expression von CD55 als auch CD59 betrifft.

Da in der vorliegenden Studie die spezifische CD59-Blockade keine erhöhte Zellschädigung unter Komplement-Attacke bewirkt (s. Abb. 3.1.2 E), obwohl eine Expression von CD59 in Myotuben belegt ist⁴³, scheidet auch dieser Komplement-Inhibitor als Defizit der Komplement-Regulation in LGMD2B-Patienten wie auch Normalkontrollen aus. Dies wird deutlich anhand der nur sehr diskreten Beteiligung von CD59 am Schutz vor Komplement-Attacke in Myotuben: trotz kombinierter CD55/CD59-Blockade erfolgt nämlich nur ein geringer Zuwachs geschädigter Myotuben aus Normalkontrollen und LGMD2B-Patienten (s. Abb. 3.1.2 E, F). Aufgrund dessen müssen zusätzliche regulatorische Einflüsse vermutet werden, die die komplement-vermittelte Zellschädigung von Myotuben garantieren. Die Bedeutung der Regulationsmechanismen verändert sich also offenbar im Laufe der Myogenese, da auf der Ebene der Myoblasten sowohl CD55 als auch CD59 noch eine bedeutende Rolle im Schutz vor komplement-vermittelter Zellschädigung in Normalkontrollen spielen⁴³.

Sowohl die Beeinträchtigung der CD55- wie auch der CD59-Funktion hängt offenbar von der zugrunde liegenden LGMD2B-Mutation ab, da sich eine CD55- bzw. CD59-Blockade für die Myotuben der Typ B-Mutation offenbar noch minimal schädigend auswirkt, während bei der Typ C-Mutation kein Zuwachs toter Zellen zu verzeichnen ist (s. Abb. 3.1.2 G). Eine mögliche Restfunktionsweise bzw. -konzentration an CD55/CD59 könnte durch eine erhaltene Restfunktion des SMAD-Pfades in der LGMD2B Typ B-Mutation erklärt werden.

4.5 CD55-/CD59-Defizienz spielt für die komplement-vermittelte Zellschädigung von Myotuben eine untergeordnete Rolle

Die vorliegende Studie zeigt, dass Myoblasten von LGMD2B-Patienten eine geringe Restfunktion der membranständigen Komplement-Inhibitoren CD55 und CD59 aufweisen, da

eine Blockade dieser Inhibitoren zu einem, wenn auch geringen, Zuwachs toter Zellen unter Komplement-Attacke führt (s. Abb. 3.1.2 E). In einem ähnlichen Komplement-Assay wurde zuvor gezeigt, dass Myoblasten aus Normalkontrollen unter CD59-Blockade zu bis zu 30%, bei Blockade von CD59 und CD55 zu bis zu 50% der ursprünglichen Zellzahl geschädigt werden⁴³. Die in der vorliegenden Studie trotz der differierenden Versuchsanordnung vergleichsweise minimale Beteiligung von CD55 am Schutz von LGMD2B-Myoblasten vor Komplement-Attacke spiegelt auf funktioneller Ebene die strukturelle CD55-Defizienz der Skelettmuskulatur wider, die bei LGMD2B-Patienten gefunden wurde¹⁰. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass die CD55-Defizienz bei LGMD2B-Patienten analog zu den Normalkontrollen schon zum Zeitpunkt der frühen Myogenese und nicht erst im Verlaufe der Zelldifferenzierung zu Myotuben auftritt.

Dass auch zum Zeitpunkt der fortgeschrittenen Myogenese bei den Myotuben eine CD55-Defizienz in LGMD2B-Patienten vorliegt, zeigt die fehlende Zunahme der komplement-vermittelten Zellschädigung unter CD55- / CD59-Blockade (s. Abb. 3.1.2 E). Hieraus lässt sich schließen, dass die 2- bis 4-fach erhöhte komplement-vermittelte Zellschädigung von LGMD2B-Myotuben (s. Abb. 3.1.2 D) nicht auf dem völligen Fehlen von CD55 beruhen dürfte. Andererseits beschreiben Gasque et al. eine fehlende CD55-Expression auf gesunden Myotuben⁴³. Ein solches Fehlen konnte in der vorliegenden Studie aus funktioneller Sicht allerdings nicht nachgehalten werden. Diesbezüglich deutet auch die nahezu lineare Korrelation der Wirkung unterschiedlicher Dosen von anti-CD55-Antikörpern auf Myotuben unter Komplement-Attacke eine Gesetzmäßigkeit an, die nicht durch das reine Fehlen von CD55-Antigen erklärt werden kann (s. Abb. 3.1.2 F). Grund für diese lineare Korrelation könnte zwar eine intrinsische toxische Aktivität des Antikörpers sein, die ab einer Konzentration von ca. 10,0 µg / ml die spezifische Toxizität des Komplements übersteigt: Gasque et al. sprechen sogar von einer spontanen Aktivierung des Komplementsystems durch Myoblasten während der Inkubation mit anti-CD59-Antikörper bzw. anti-CD55-Antikörper⁴³, was auch für Myotuben gelten könnte. Wie jedoch Abb. 3.1.2 F zeigt, war die anti-CD55-Antikörper-Konzentration von 5,0 µg/ml nicht geeignet für eine spontane Aktivierung des Komplementsystems, da sich hierunter ein im Vergleich zur Kontrollbehandlung nahezu identischer Wert für PI-positive Zellen ergab. Bei dieser im gesamten übrigen Versuchsprotokoll jedoch eingesetzten Dosis des Anti-CD55-Antikörpers kam es zu einer Zunahme toter Zellen aus der LGMD2B-Familie B unter Komplement-Attacke. Somit ist hier eine gewisse (Rest-)Resistenz gegenüber Komplement anzunehmen,

die sich durch anti-CD55-Antikörperbehandlung reduzieren ließ (s. Abb. 3.1.2 E). Konträr hierzu bewirkte die Antikörperbehandlung bei Zellen der LGMD2B-Familie C keine Zunahme PI-positiver Signale, so dass hier von einer geringeren Resistenz gegenüber Komplement ausgegangen werden muss, wodurch die Antikörperzugabe keinen Einfluss auf die Zahl geschädigter Zellen hatte. Es ist anzunehmen, dass der Anstieg der Zahlen PI-positiver Zellen von Normalkontrollen und LGMD2B-Patienten unter CD55-Inhibition in einigen Experimenten (s. Abb. 3.1.2 E, F) die übergangsweise erhaltene Rest-Expression von CD55 auf dem Wege der Myogenese repräsentiert.

4.6 Funktionell relevante Schädigung von Myotuben kann durch Defizienz löslicher Komplement-Regulatoren erklärt werden

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass bei fortschreitender Differenzierung normaler Muskelzellen zu mehrkernigen Myotuben die Komplement-Inhibitoren CD55 und CD59 nicht mehr wie bei Myoblasten als hauptsächlicher Mechanismus vor Komplement-Angriff schützen, sondern im Verlauf nur eine untergeordnete Rolle annehmen. Dies könnte Folge derselben Veränderung sein, die eine insgesamt sehr viel geringere Empfindlichkeit von Komplement auf Myotuben gegenüber Myoblasten im Zuge der Differenzierung bewirkt. So ist neben der Ausbildung weiterer membranständiger Komplement-Inhibitoren die vermehrte Produktion löslicher Komplement-Inhibitoren denkbar, die bereits zum Zeitpunkt des Myoblastenalters der Zelle nachgewiesen ist⁴³, sich jedoch erst bei Differenzierung zu Myotuben zu einem wichtigen Schutz-Faktor entwickelt.

Vor dem Hintergrund eines bestehenden komplement-spezifischen Schädigungsmusters, welches aus der vorliegenden Studie vor allem für Zellen von LGMD2B-Patienten belegt wurde, müssen zusätzliche Mechanismen der Komplement-Regulation unzulänglich sein: Der funktionell entscheidende Schutz von Myotuben vor komplement-vermittelter Zellschädigung könnte von den löslichen Komplement-Inhibitoren C1-Inhibitor, Faktor H, S-Protein und Clusterin ausgehen, welche von Myoblasten und Myotuben konstitutionell exprimiert werden⁴³. Das Expressionsmuster und damit die Menge produzierter Komplement-Inhibitoren könnte sich im Verlauf der Zelldifferenzierung verschieben von den membranständigen hin zu den löslichen Faktoren, welche nach und nach immer stärkeren Anteil am Schutz vor komplement-vermittelter Zellschädigung normaler Muskelzellen gewinnen würden.

Als Konsequenz dieser Hypothese wäre die verstärkte Empfindlichkeit von LGMD2B-Myotuben gegenüber Komplement ebenfalls Folge einer Defizienz löslicher Komplement-Inhibitoren und die strukturelle CD55- sowie funktionelle CD59-Defizienz ohne Relevanz bezüglich der (physiologischen) Komplement-Angriffe. Zur Überprüfung dieser Hypothese wären weitere Versuche zur Beteiligung löslicher Komplement-Inhibitoren an der komplement-vermittelten Zellschädigung in LGM2B-Patienten angezeigt, um die Dynamik des Pathomechanismus zu verstehen und so Angriffspunkte für zukünftige pharmakologische Interventionen definieren zu können.

4.7 C5-Komplement-Inhibition verzögert im Mausmodell Zeichen der dysferlin-defizienten Muskeldystrophie

Die vorliegende Studie zeigt erstmals einen therapeutischen Erfolg bei der Behandlung der LGMD2B im Mausmodell insofern, als dass im histologischen Bild das spontane Fortschreiten der Muskeldystrophie, ersichtlich an der Zahl nekrotischer Fasern, deutlich verlangsamt wird.

Erstmals wird hier auch die Effektivität der C5-Komplement-Inhibition für die Behandlung einer Muskelerkrankung beschrieben. Anfänglich wurde die Komplement-Inhibition auf der Ebene der C3-Konvertase pharmakologisch eingesetzt, um die Rolle von Komplement bei der Pathogenese von so unterschiedlichen Erkrankungen wie Xenotransplantat-Abstoßung, Immunkomplexreaktionen der Lunge und Haut, Experimentelle Allergische Enzephalomyelitis sowie Gewebsuntergang nach kardiopulmonalem Bypass und Reperfusion nach Ischämie zu untersuchen^{83,84}.

Der therapeutischen Inhibition der Komplementkaskade auf der Ebene von C3-Konvertase haften jedoch potentiell schwerwiegende Nebenwirkungen an. So ist die Entstehung von C3b für die normale Phagozytose bakterieller Pathogene sowie die Beseitigung zirkulierender Immunkomplexe mitverantwortlich⁸⁵, während Patienten mit C3-Gendefekt an rekurrierenden lebensbedrohlichen Infektionen sowie erhöhtem Risiko einer Erkrankung an Lupus erythematodes und Autoimmun-Glomerulonephritis leiden⁸⁶.

Eine Komplementblockade auf der Ebene von C5 hingegen verhindert die Bildung der pro-inflammatorischen und zytotoxischen Faktoren C5a und MAC, ohne die C3b-Konzentration zu verringern. Patienten mit genetischer C5-Defizienz erkranken zwar im Vergleich zur Normalbevölkerung gehäuft an Infektionen mit Neisserien, diese verlaufen aber milder als bei

Patienten ohne C5-Defizienz⁸⁶.

Aufgrund fehlender endogener Inhibitoren der C5-Konvertase wurden deshalb im weiteren Verlauf monoklonale Antikörper gegen C5 entwickelt, die dessen Spaltung durch die C5-Konvertase verhindern. Wirkungsvoll haben sich diese Antikörper bereits beim akuten kardialen Gewebsuntergang an Modellen des perfundierten Herzens, bei Leukozyten- und Plättchenaktivierung am Modell des kardiopulmonalen Bypasses, bei der Infarktgröße am Modell des Herzinfarkts, bei der Progression der Arthritis am Maus-Modell sowie bei der Entwicklung der Glomerulonephritis am Modell des Systemischen Lupus erythematoses erwiesen^{83,84}.

Da die im SJL/J-Mausmodell beobachteten histologischen Veränderungen weitgehend denen von Patienten mit LGMD2B ähneln⁴⁵, ist zu erwarten, dass der in der vorliegenden Studie beschriebene Behandlungseffekt durch C5-Komplement-Inhibition auch auf die Therapie von Patienten übertragbar ist.

Der Nachweis des protektiven Effekts der Anti-C5-Antikörper-Behandlung auf die Entwicklung der Muskeldystrophie gelingt hier allerdings nur für die Muskelfasernekrosen. Dieser Parameter bietet das histologisch auffälligste Bild und eine homogene Verteilung der Zahlenwerte. Aber auch die Parameter der binnenständigen Nuclei und des Fasersplittings sind bei Anti-C5-Antikörper behandelten Tieren tendenziell weniger ausgeprägt zu finden. Ein statistisch überzeugender Unterschied ließ sich hier vermutlich aufgrund der inhomogenen Verteilung der Zahlenwerte nicht zeigen.

Prinzipiell könnte der nur minimale Behandlungseffekt einiger Parameter auf eine unzureichende Dosierung im Behandlungsschema zurückzuführen sein. Die in der vorliegenden Studie eingesetzte Antikörper-Dosis war ausreichend, um in vivo die akute vaskuläre Abstoßungsreaktion bei Allotransplantation des Herzens bei der Maus⁷⁷ zu verhindern und war höher dosiert als zur erfolgreichen Verhinderung der hyperakuten Abstoßungsreaktion bei Allotransplantation des Mauserzens⁷⁶ erforderlich war. Beide Dosierungen liegen zwar 30-60 fach über den üblicherweise beim Menschen eingesetzten Dosen mit vergleichbarem Anti-C5-Antikörper (Eculizumab) bei der Paroxysmalen Nächtlichen Hämoglobinurie^{87,88}. Da Eculizumab jedoch nur intravaskulär wirken soll, ist es als großes Molekül angelegt, welches schlecht gewebebegänglich ist. Monoklonale Antikörper penetrieren nämlich als große Moleküle sehr viel langsamer ins Gewebe als Fab-Fragmente⁸⁹ oder Einzelketten Fv-Moleküle⁹⁰.

Durch die höhere Dosierung des Anti-C5-Antikörpers der vorliegenden Studie, der ebenfalls als großes Molekül vorliegt, soll also eine extravaskuläre Wirkung im Muskel gewährleistet werden. Nichtsdestotrotz besteht für den Einsatz einer Dosis in der Größenordnung wie bei der Maus beim Patienten die Gefahr zusätzlicher unerwünschter Effekte, so dass die Verbesserung der Gewebegängigkeit des Antikörpers durch Entwicklung von Antikörperfragmenten vorrangig wäre, um eine geringere Dosierung bei gleichem Behandlungseffekt zu ermöglichen.

Dennoch wird bei der Betrachtung des von Tier zu Tier höchst individuellen Verlaufes der Muskeldystrophie deutlich, dass der Krankheitsprogress interindividuell sowohl zeitlich als auch in der Intensität stark variiert. In der Folge wird ein Therapieeffekt auf gleichermaßen inkonstante histologische Parameter durch die unterschiedlichen Ausgangsbedingungen bei Therapiebeginn deutlich unterschiedlich ausfallen bzw. eine sehr viel größere Streubreite im Behandlungseffekt erzielt werden.

Aufgrund dessen muss vermutet werden, dass die Therapie mit Anti-C5-Antikörpern im SJL/J-Mausmodell lediglich für die Entwicklung von Muskelfasernekrosen unabhängig vom Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns bzw. der Schwere des Verlaufs günstige Effekte aufweist. Bei LGMD2B Patienten könnte deshalb analog zum Mausmodell der Behandlungseffekt auf die Mehrzahl der dystrophischen Veränderungen abhängig von der rechtzeitigen Diagnose der Erkrankung sein. Ob diese frühzeitige Behandlung auch einen höheren Behandlungseffekt bewirkt, ließe sich im Mausmodell anhand von zusätzlichen Probenbiopsien vor Behandlungsbeginn klären, um eine Eichung der Krankheitsverläufe zu gewährleisten, die eine zeitliche Zuordnung von Behandlungsbeginn und –effekt ermöglicht.

Bis ein verlässliches Protokoll zur Einschätzung der motorischen Leistung von SJL/J Mäusen unter C5-Komplement-Inhibition existiert, kann jedoch über die Ausprägung des wichtigsten Parameters des Behandlungserfolges, des klinischen Benefits, sowohl für den Tierversuch als auch für LGMD2B-Patienten nur spekuliert werden.

4.8 Ausblick: Pathomechanismus der Muskeldystrophie in LGMD2B

Neben den therapeutischen Implikationen bietet der Behandlungserfolg der vorliegenden Studie auch ein plausibles muskelspezifisches Modell für den Pathomechanismus in LGMD2B: die erhöhte Komplement-Toxizität des Muskels bei Komplement-Inhibitor-Defizienz führt zur vermehrten Muskelschädigung bei physiologischer subklinischer und klinischer

Traumatisierung des Muskels im Alltag.

Vermutlich existieren darüber hinaus noch weitere, unspezifische Schädigungsmechanismen des Muskels: im Gefäßendothel ist CD55 für die Aufrechterhaltung der Endothel-Integrität unter entzündungsbedingter Zytokinausschüttung mitverantwortlich; so verdreifacht sich die CD55-Expression unter Stimulation mit TNF- α und führt damit zu einer Verringerung von Komplement-Deposition am Endothel um 40%⁵³. Für LGMD2B-Patienten ist daher auch eine Muskelschädigung als Folge einer unspezifischen Entzündungssituation des Organismus, z.B. bei Erkältung mit Fieber, denkbar, die durch vaskuläre Leckage mit konsekutiver Bildung entzündlicher Infiltrate im Gewebe entsteht.

Zur Etablierung möglicher therapeutischer Ansätze sind in der Folge sowohl weitere Grundlagenforschung zum Verständnis des Pathomechanismus als auch neue Therapiestudien mit komplement-regulierenden Faktoren essentiell, um Patienten mit diesem schwerwiegenden Krankheitsbild der Gliedergürteldystrophie zukünftig eine effektive Behandlung zukommen lassen zu können.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Aoki M, Liu J, Richard I, Bashir R, Britton S, Keers SM et al. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology* 2001; 57(2):271-278.
2. Bejaoui K, Hirabayashi K, Hentati F, Haines JL, Ben Hamida C, Belal S et al. Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14. *Neurology* 1995; 45(4):768-772.
3. Diers A, Carl M, Stoltenburg-Didinger G, Vorgerd M, Spuler S. Painful enlargement of the calf muscles in limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B) with a novel compound heterozygous mutation in DYSF. *Neuromuscul Disord* 2007; 17(2):157-162.
4. Wenzel K, Carl M, Perrot A, Zabojszcza J, Assadi M, Ebeling M et al. Novel sequence variants in dysferlin-deficient muscular dystrophy leading to mRNA decay and possible C2-domain misfolding. *Hum Mutat* 2006; 27(6):599-600.
5. Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M et al. 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. Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998; 20(1):31-36.
7. Anderson LV, Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *Am J Pathol* 1999; 154(4):1017-1022.
8. Bushby KM. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain* 1999; 122 (Pt 8):1403-1420.
9. Spuler S, v.Moers A. Muskelkrankheiten. Spuler SvM, editor. 2004. Schattauer Verlag, Stuttgart.
10. Wenzel K, Zabojszcza J, Carl M, Taubert S, Lass A, Harris CL et al. Increased susceptibility to complement attack due to down-regulation of decay-accelerating factor/CD55 in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *J Immunol* 2005; 175(9):6219-6225.
11. Engel AG, Banker B.Q., McKnight WL, Franzini-Armstrong C. *Myology*. 3rd ed. McGraw-Hill, 2003.
12. Engel AG, Biesecker G. Complement activation in muscle fiber necrosis: demonstration of the membrane attack complex of complement in necrotic fibers. *Ann Neurol* 1982; 12(3):289-296.
13. Banker BQ, Engel AG. Basic Reactions of Muscle. In: Engel AG, editor. *Myology - basic and clinical*. New York: McGraw-Hill, 1994: 832-888.

14. O'Brien KF, Kunkel LM. Dystrophin and muscular dystrophy: past, present, and future. *Mol Genet Metab* 2001; 74(1-2):75-88.
15. Selcen D, Stilling G, Engel AG. The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology* 2001; 56(11):1472-1481.
16. Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 2003; 423(6936):168-172.
17. Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RH, Jr. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(50):50466-50473.
18. Anderson LV, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Human Molecular Genetics* 1999; 8(5):855-861.
19. Bansal D, Campbell KP. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol* 2004; 14(4):206-213.
20. Allen RE, Temm-Grove CJ, Sheehan SM, Rice G. Skeletal muscle satellite cell cultures. *Methods Cell Biol* 1997; 52:155-176.
21. Campion DR. The muscle satellite cell: a review. *Int Rev Cytol* 1984; 87:225-251.
22. Kaufman SJ, Foster RF. Replicating myoblasts express a muscle-specific phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(24):9606-9610.
23. Lawson-Smith MJ, McGeachie JK. The identification of myogenic cells in skeletal muscle, with emphasis on the use of tritiated thymidine autoradiography and desmin antibodies. *J Anat* 1998; 192 (Pt 2):161-171.
24. Lazarides E, Hubbard BD. Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73(12):4344-4348.
25. Illa I, Leon-Monzon M, Dalakas MC. Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. *Ann Neurol* 1992; 31(1):46-52.
26. Belles-Isles M, Roy R, Dansereau G, Goulet M, Roy B, Bouchard JP et al. Rapid selection of donor myoblast clones for muscular dystrophy therapy using cell surface expression of NCAM. *Eur J Histochem* 1993; 37(4):375-380.
27. Schubert W, Zimmermann K, Cramer M, Starzinski-Powitz A. Lymphocyte antigen Leu-19 as a molecular marker of regeneration in human skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(1):307-311.
28. Shainberg A, Yagil G, Yaffe D. Alterations of enzymatic activities during muscle differentiation in vitro. *Dev Biol* 1971; 25(1):1-29.
29. Cattoretti G, Schiro R, Orazi A, Soligo D, Colombo MP. Bone marrow stroma in humans: anti-nerve growth factor receptor antibodies selectively stain reticular cells in vivo and in

vitro. *Blood* 1993; 81(7):1726-1738.

30. Haynes BF, Scearce RM, Lobach DF, Hensley LL. Phenotypic characterization and ontogeny of mesodermal-derived and endocrine epithelial components of the human thymic microenvironment. *J Exp Med* 1984; 159(4):1149-1168.
31. Stewart JD, Masi TL, Cumming AE, Molnar GM, Wentworth BM, Sampath K et al. Characterization of proliferating human skeletal muscle-derived cells in vitro: differential modulation of myoblast markers by TGF-beta2. *J Cell Physiol* 2003; 196(1):70-78.
32. Nadal-Ginard B. Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis. *Cell* 1978; 15(3):855-864.
33. Huard J, Roy R, Bouchard JP, Malouin F, Richards CL, Tremblay JP. Human myoblast transplantation between immunohistocompatible donors and recipients produces immune reactions. *Transplant Proc* 1992; 24(6):3049-3051.
34. Labrecque C, Roy R, Tremblay JP. Immune reactions after myoblast transplantation in mouse muscles. *Transplant Proc* 1992; 24(6):2889-2892.
35. Tremblay JP, Malouin F, Roy R, Huard J, Bouchard JP, Satoh A et al. Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant* 1993; 2(2):99-112.
36. Hohlfeld R, Engel AG. Lysis of myotubes by alloreactive cytotoxic T cells and natural killer cells. Relevance to myoblast transplantation. *J Clin Invest* 1990; 86(1):370-374.
37. Tsujihata M, Yoshimura T, Satoh A, Kinoshita I, Matsuo H, Mori M et al. Diagnostic significance of IgG, C3, and C9 at the limb muscle motor end-plate in minimal myasthenia gravis. *Neurology* 1989; 39(10):1359-1363.
38. Nakano S, Engel AG. Myasthenia gravis: quantitative immunocytochemical analysis of inflammatory cells and detection of complement membrane attack complex at the end-plate in 30 patients. *Neurology* 1993; 43(6):1167-1172.
39. Morgan BP, Sewry CA, Siddle K, Luzio JP, Campbell AK. Immunolocalization of complement component C9 on necrotic and non-necrotic muscle fibres in myositis using monoclonal antibodies: a primary role of complement in autoimmune cell damage. *Immunology* 1984; 52(1):181-188.
40. Sewry CA, Dubowitz V, Abrahama A, Luzio JP, Campbell AK. Immunocytochemical localisation of complement components C8 and C9 in human diseased muscle. The role of complement in muscle fibre damage. *J Neurol Sci* 1987; 81(2-3):141-153.
41. Emslie-Smith AM, Engel AG. Necrotizing myopathy with pipestem capillaries, microvascular deposition of the complement membrane attack complex (MAC), and minimal cellular infiltration. *Neurology* 1991; 41(6):936-939.
42. Spuler S, Engel AG. Unexpected sarcolemmal complement membrane attack complex deposits on nonnecrotic muscle fibers in muscular dystrophies. *Neurology* 1998; 50(1):41-46.

43. Gasque P, Morgan BP, Legoedec J, Chan P, Fontaine M. Human skeletal myoblasts spontaneously activate allogeneic complement but are resistant to killing. *J Immunol* 1996; 156(9):3402-3411.
44. Gallardo E, Rojas-Garcia R, De Luna N, Pou A, Brown RH, Jr., Illa I. Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology* 2001; 57(11):2136-2138.
45. Confalonieri P, Oliva L, Andreetta F, Lorenzoni R, Dassi P, Mariani E et al. Muscle inflammation and MHC class I up-regulation in muscular dystrophy with lack of dysferlin: an immunopathological study. *J Neuroimmunol* 2003; 142(1-2):130-136.
46. Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J* 1989; 264(1):1-14.
47. Morgan BP, Gasque P. Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunol Today* 1996; 17(10):461-466.
48. Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol* 2004; 41(11):1089-1098.
49. Morgan BP. Complement regulatory molecules: application to therapy and transplantation. *Immunol Today* 1995; 16(6):257-259.
50. Morgan BP, Meri S. Membrane proteins that protect against complement lysis. *Springer Semin Immunopathol* 1994; 15(4):369-396.
51. Pasch MC, Bos JD, Daha MR, Asghar SS. Transforming growth factor-beta isoforms regulate the surface expression of membrane cofactor protein (CD46) and CD59 on human keratinocytes [corrected]. *Eur J Immunol* 1999; 29(1):100-108.
52. Cocuzzi ET, Bardenstein DS, Stavitsky A, Sundarraj N, Medof ME. Upregulation of DAF (CD55) on orbital fibroblasts by cytokines. Differential effects of TNF-beta and TNF-alpha. *Curr Eye Res* 2001; 23(2):86-92.
53. Mason JC, Yarwood H, Sugars K, Morgan BP, Davies KA, Haskard DO. Induction of decay-accelerating factor by cytokines or the membrane-attack complex protects vascular endothelial cells against complement deposition. *Blood* 1999; 94(5):1673-1682.
54. Ahmad SR, Lidington EA, Ohta R, Okada N, Robson MG, Davies KA et al. Decay-accelerating factor induction by tumour necrosis factor-alpha, through a phosphatidylinositol-3 kinase and protein kinase C-dependent pathway, protects murine vascular endothelial cells against complement deposition. *Immunology* 2003; 110(2):258-268.
55. Mason JC, Lidington EA, Ahmad SR, Haskard DO. bFGF and VEGF synergistically enhance endothelial cytoprotection via decay-accelerating factor induction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282(3):C578-C587.
56. Mason JC, Steinberg R, Lidington EA, Kinderlerer AR, Ohba M, Haskard DO. Decay-accelerating factor induction on vascular endothelium by vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via a VEGF receptor-2 (VEGF-R2)- and protein kinase C-alpha/epsilon (PKCalpha/epsilon)-dependent cytoprotective signaling pathway and is

inhibited by cyclosporin A. *J Biol Chem* 2004; 279(40):41611-41618.

57. Watchko JF, O'Day TL, Hoffman EP. Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models. *J Appl Physiol* 2002; 93(2):407-417.
58. Walter MC, Lochmuller H, Reilich P, Klopstock T, Huber R, Hartard M et al. Creatine monohydrate in muscular dystrophies: A double-blind, placebo-controlled clinical study. *Neurology* 2000; 54(9):1848-1850.
59. Blau HM, Webster C. Isolation and characterization of human muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(9):5623-5627.
60. Watt DJ, Morgan JE, Partridge TA. Use of mononuclear precursor cells to insert allogeneic genes into growing mouse muscles. *Muscle Nerve* 1984; 7(9):741-750.
61. Rando TA, Blau HM. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol* 1994; 125(6):1275-1287.
62. Partridge TA, Grounds M, Sloper JC. Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. *Nature* 1978; 273(5660):306-308.
63. Karpati G, Pouliot Y, Zubrzycka-Gaarn E, Carpenter S, Ray PN, Worton RG et al. Dystrophin is expressed in mdx skeletal muscle fibers after normal myoblast implantation. *Am J Pathol* 1989; 135(1):27-32.
64. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 1989; 337(6203):176-179.
65. Gussoni E, Pavlath GK, Lanctot AM, Sharma KR, Miller RG, Steinman L et al. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* 1992; 356(6368):435-438.
66. Cleland JG, Coletta AP, Abdellah AT, Nasir M, Hobson N, Freemantle N et al. Clinical trials update from the American Heart Association 2006: OAT, SALT 1 and 2, MAGIC, ABCD, PABA-CHF, IMPROVE-CHF, and percutaneous mitral annuloplasty. *Eur J Heart Fail* 2007; 9(1):92-97.
67. Bittner RE, Anderson LV, Burkhardt E, Bashir R, Vafiadaki E, Ivanova S et al. Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Genet* 1999; 23(2):141-142.
68. Ho M, Post CM, Donahue LR, Lidov HG, Bronson RT, Goolsby H et al. Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency. *Human Molecular Genetics* 2004; 13(18):1999-2010.
69. Voskuhl RR. Chronic Relapsing Experimental Allergic Encephalomyelitis in the SJL Mouse: Relevant Techniques. *Methods* 1996; 10(3):435-439.
70. 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):833-839.

71. Franzini-Armstrong C, Engel AG. Polymyositis and Dermatomyositis. In: Engel AG, editor. Myology - basic and clinical. McGraw-Hill: New York, 1994: 1335-1383.
72. Wenzel K, Geier C, Qadri F, Hubner N, Schulz H, Erdmann B et al. Dysfunction of dysferlin-deficient hearts. J Mol Med 2007; 85(11):1203-1214.
73. Rafael JA, Nitta Y, Peters J. Testing of SHIRPA, a mouse phenotypic assessment protocol, on Dmd(mdx) and Dmd(mdx3cv) dystrophin-deficient mice. Mamm Genome 11, 725-728. 2000.
74. Lochmuller H, Johns T, Shoubridge E.A. Expression of the E6 and E7 Genes of Human Papillomavirus (HPV16) Extends the Life Span of Human Myoblasts. Exp.Cell Res. 248, 186-193. 1999.
75. Kroshus TJ, Rollins SA, Dalmaso AP, Elliott EA, Matis LA, Squinto SP et al. Complement inhibition with an anti-C5 monoclonal antibody prevents acute cardiac tissue injury in an ex vivo model of pig-to-human xenotransplantation. Transplantation 1995; 60(11):1194-1202.
76. Wang H, Rollins SA, Gao Z, Garcia B, Zhang Z, Xing J et al. Complement inhibition with an anti-C5 monoclonal antibody prevents hyperacute rejection in a xenograft heart transplantation model. Transplantation 1999; 68(11):1643-1651.
77. Wang H, Jiang J, Liu W, Kubelik D, Chen G, Gies D et al. Prevention of acute vascular rejection by a functionally blocking anti-C5 monoclonal antibody combined with cyclosporine. Transplantation 2005; 79(9):1121-1127.
78. Rustenbach SJ. Metaanalyse. Eine anwendungsorientierte Einführung. Göttingen: Huber, 2003.
79. Cohen J. Weighted Kappa - Nominal Scale Agreement with Provision for Scaled Disagreement Or Partial Credit. Psychological Bulletin 1968; 70(4):213-&.
80. Asendorpf J. Psychologie der Persönlichkeit. 3. ed. Berlin: Springer, 2004.
81. Hedges LV, Olkin I. Statistical methods for meta-analysis. 1985. San Diego (Kalifornien), USA, Academic Press.
82. Franzini-Armstrong C, Fischman DA. Morphogenesis of Skeletal Muscle Fibers. In: Engel AG, editor. Myology - basic and clinical. New York: McGraw-Hill, 1994: 74-95.
83. Wang Y. Complementary therapies for inflammation. Nat Biotechnol 2006; 24(10):1224-1226.
84. Thomas TC, Rollins SA, Rother RP, Giannoni MA, Hartman SL, Elliott EA et al. Inhibition of complement activity by humanized anti-C5 antibody and single-chain Fv. Mol Immunol 1996; 33(17-18):1389-1401.
85. Liszewski MK, Atkinson J.P. The Complement System. In: Paul WE, editor. Fundamental Immunology. New York: Raven Press, 1993: 917-939.
86. Ross SC, Densen P. Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis

and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine (Baltimore)* 1984; 63(5):243-273.

87. Hillmen P, Hall C, Marsh JC, Elebute M, Bombara MP, Petro BE et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2004; 350(6):552-559.
88. Hill A, Hillmen P, Richards SJ, Elebute D, Marsh JC, Chan J et al. Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106(7):2559-2565.
89. Covell DG, Barbet J, Holton OD, Black CD, Parker RJ, Weinstein JN. Pharmacokinetics of monoclonal immunoglobulin G1, F(ab')₂, and Fab' in mice. *Cancer Res* 1986; 46(8):3969-3978.
90. Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 1992; 52(12):3402-3408.

LEBENS LAUF

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

PUBLIKATIONSLISTE

Wenzel K., Zabojszcza J., Carl M., Taubert S., Lass A., Harris C. L., Ho M., Schulz H., Hummel O., Hubner N., Osterziel K. J., Spuler S. Increased susceptibility to complement attack due to down-regulation of decay-accelerating factor/CD55 in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *J.Immunol.* 175[9], 6219-6225. 1-11-2005

Schmidt S., Vieweger A., Obst M., Mueller S., Gross V., Gutberlet M., Steinbrink J., Taubert S., Misselwitz B., Luedemann L., Spuler S. Dysferlin-deficient muscular dystrophy: gadofluorine M suitability at MR imaging in a mouse model. *Radiology* 2009 Jan;250(1):87-94

DANKSAGUNG

Ich danke der Fakultät der Charité Universitätsmedizin Berlin für die Gelegenheit zur Promotion.

Mein besonderer Dank geht an Fr. Prof. Dr. med. Simone Spuler für die Überlassung des Dissertations-Themas als Teil eines besonders seltenen Forschungsgebietes mit zugleich gewichtigen grundlegenden Implikationen für andere Forschungsgegenstände.

Vor allem aber bin ich dankbar für ihre außerordentliche menschliche Betreuung der Arbeit, die sich nicht nur in ihrer sehr kollegialen Anleitung und ihren erfrischend inspirierenden Anregungen äußerte.

ERKLÄRUNG

Ich, Semjon Taubert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Komplement-vermittelte Zellschädigung als Pathomechanismus der Dysferlin-defizienten Gliedergürteldystrophie“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Weimar, den 22.06.2010

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'S' followed by a cursive 'emjon' and a horizontal line.

Semjon Taubert