

Aus der Abteilung Muskelkrankheiten  
Experimental and Clinical Research Center (ECRC)  
der Medizinischen Fakultät der Charité in Kooperation mit dem Max Delbrück  
Center for Molecular Medicine, Berlin

DISSERTATION

*Verlauf der Muskeldystrophie bei der Dysferlin-defizienten SJL/J-  
Maus*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Antje Vieweger  
aus Berlin

Gutachter:       1. Prof. Dr. med. S. Spuler  
                      2. Prof. Dr. med. S. Rudnik-Schöneborn  
                      3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Schmidt

Datum der Promotion: 08.04.2011

# 1 Zusammenfassung

Die Dysferlin-defiziente Muskeldystrophie ist eine autosomal rezessive seltene Erkrankung, die im jungen Erwachsenenalter beginnt und innerhalb von 10 bis 15 Jahren zum Verlust der Gehfähigkeit führt. Eine Therapie gibt es nicht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, ein natürliches Mausmodell der Dysferlin-defizienten Muskeldystrophie, die SJL/J-Maus, zu charakterisieren und prospektiv in einer longitudinalen Untersuchung reproduzierbare Parameter des Krankheitsverlaufs zu definieren. Die SJL/J-Mäuse wurden mit gesunden C57BL/6-Mäusen verglichen. An einer Gesamtzahl von 50 Tieren (36 SJL/J, 14 C57BL/6) wurden sechs klinische Parameter (Gewicht, Fellbeschaffenheit, Spontanmotorik, Laufrad und zwei Krafttests) und sechs histologische Merkmale (Fasersplitting, Nekrose, Entzündung, Faserdurchmesser, Bindegewebsvermehrung und binnenständige Nuklei) zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen der 4. und der 42. Lebenswoche untersucht. Nach einer therapeutischen Intervention mit Komplement-Inhibition (Anti-C5-Antikörper, Isotypen-Kontrolle und Albumin-Scheinbehandlung) bei 54 SJL/J-Mäusen zwischen der 24. und 28. Lebenswoche wurden in allen Gruppen die histologischen Veränderungen bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass wie beim Menschen auch bei der SJL/J-Maus die Krankheit in der ersten Lebensphase klinisch und histologisch unauffällig ist. Erste histologische Veränderungen finden sich in der 18. - 20. Lebenswoche. Diese nehmen bis zur 30. Lebenswoche progredient zu. Von da an zeigt sich das Vollbild einer Muskeldystrophie mit bindegewebigem Umbau der Muskulatur. Die empfindlichsten Parameter waren die Anzahl nekrotischer und Split-Fasern. Dagegen war kein klinischer Test so reproduzierbar, dass er für die Bestimmung der Krankheitsprogredienz geeignet war. Nach Therapie mit Anti-C5-Antikörpern war die Anzahl pathologisch veränderter Skelettmuskelbiopsien der SJL/J-Maus signifikant geringer. Ein interessanter Nebenaspekt der Analysen war, dass ein Teil der SJL/J-Mäuse im Krankheitsverlauf AA-Amyloid bildeten. Die SJL/J-Maus ist im Alter von vielen Komorbiditäten betroffen, die ab der 30. Lebenswoche eine alleinige Beurteilung der Muskeldystrophie unmöglich machen.

Diese Untersuchungen lassen die Schlussfolgerungen zu, dass für einen Zeitraum von der 18. bis zur 30. Lebenswoche die SJL/J-Maus ein gutes Tiermodell ist, um histologisch den

Krankheitsverlauf zu beurteilen und ggf. therapeutisch zu modifizieren. Die hier durchgeführten nicht-invasiven klinischen Tests waren dagegen für longitudinale Beobachtungen ungeeignet. Inzwischen haben wir auch zeigen können, dass kernspintomographische Untersuchungen der Muskulatur der klinischen Evaluierung bei der Maus überlegen sind.

## 2 Abstrakt

**Einleitung:** Die SJL/J-Maus hat eine Splice Site Mutation im *Dysf* und dient daher als Tiermodell für die Gliedergürtelmuskeldystrophie 2B (LGMD 2B).

**Ziel der Untersuchung:** Wir wollten eine detaillierte klinische und histologische Charakterisierung dieses Mausmodells vornehmen und Alter bei Krankheitsbeginn, klinische Progression und histopathologische Veränderungen in Skelettmuskel und Herz beschreiben.

**Material und Methoden:** Die SJL/J-Mäuse verschiedenen Alters wurden untersucht und mit gleichaltrigen C57BL/6-Kontrollen verglichen. Die klinische Untersuchung wurde gemäß eines modifizierten SHIRPA-Protokolls durchgeführt. Biopsien aus Herz- und Skelettmuskel wurden entnommen, gefärbt und ausgewertet. Das Amyloid wurde immunhistologisch untersucht und mittels Western Blot bestätigt. In einer Interventionsstudie wurde die Gabe von Anti-C5-Antikörpern mit IgG-Isotypen-Kontrolle und Albumin verglichen.

**Ergebnisse:** Die klinischen Tests ermöglichten keine sichere Differenzierung zwischen kranken und gesunden Tieren. In der Histologie zeigten 14 - 20 Wochen alte SJL/J-Mäuse wenig pathologische Merkmale. Die 30 - 34 Wochen alten SJL/J-Mäuse wiesen alle Dystrophiezeichen in hohen Zahlen auf. Einige Mäuse entwickelten Amyloidablagerungen in den Herzschnitten, welches als AA-Amyloid charakterisiert wurde. Die Kontrollen zeigten keine myopathologischen Zeichen. Der Interventionsversuch ergab signifikant weniger Nekrosen in der Anti-C5-AK-Gruppe als in der Albumin-Gruppe.

**Diskussion:** Zwischen der 18. und 28. Lebenswoche der SJL/J-Maus sind die histologischen Parameter geeignet, die Progression der Muskeldystrophie zu monitoren. Klinische Tests waren zu allen Zeitpunkten nicht zuverlässig. Bei älteren Tieren sind die Komorbiditäten so ausgeprägt, dass ab der 30. Lebenswoche die SJL/J-Maus zur



Dysferlin-Forschung ungeeignet ist. Dysferlin-Defizienz scheint eine Amyloidbildung zu begünstigen.

Schlagwörter: SJL/J-Maus, Dysferlinopathie, Amyloid, Anti-C5-Antikörper

### 3 Abstract

**Introduction:** SJL/J mice have a splice site mutation in the Dysferlin gene and thus serve as an animal model for limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD 2B).

**Aim:** We wanted to make a detailed clinical and histopathological characterization of the SJL/J mouse model determining age at onset, clinical progression and histopathological changes in skeletal muscle and heart.

**Material and Methods:** SJL/J mice at different ages were compared to age-matched C57BL/6 controls. Clinical tests were conducted according to a modified SHIRPA-Protocol. Biopsies were taken of heart and quadriceps, stained and characterized morphologically. The amyloid was examined immunohistologically, results confirmed via Western blot. An interventional trial comparing the effects of anti-C5-antibodies with those of IgG-isotype control and albumin was performed.

**Results:** The clinical tests did not allow discrimination between healthy and affected animals. In muscle histology young SJL/J mice showed little pathological signs. The older SJL/J mice's sections displayed in abundance all characteristics of a dystrophic muscle. In some animals amyloid was found in heart sections, which was characterized as AA-amyloid. Controls showed no myopathological signs. Mice treated with anti-C5-antibodies showed significantly less necrotic fibres than those treated with albumin.

**Discussion:** Between weeks 18 - 28 of age histologic markers are suitable to monitor muscle dystrophy progression in SJL/J mice. Clinical tests were not reliable at these times. Older animals display pronounced comorbidities that make them unsuitable for further dystrophy research. Dysferlin deficiency seems to promote formation of amyloid.

Keywords: SJL/J-Mice, dysferlinopathy, amyloid, anti-C5-antibody

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	III
2	Abstrakt .....	IV
3	Abstract .....	V
	Widmung .....	1
4	Abkürzungsverzeichnis .....	2
5	Einleitung .....	3
5.1	Neuromuskuläre Erkrankungen .....	3
5.2	Muskeldystrophien .....	3
5.2.1	Ätiologie .....	4
5.2.2	Gliedergürtelmuskeldystrophien .....	4
5.2.3	Gliedergürtelmuskeldystrophie 2B .....	5
5.2.3.1	Ätiologie .....	5
5.2.3.2	Dysferlin .....	5
6	Herleitung der Aufgabe .....	8
7	Material und Methoden .....	11
7.1	Material .....	11
7.2	Methoden .....	13
7.2.1	Mäuse .....	13
7.2.2	Klinische Untersuchung .....	13
7.2.3	Histologische Untersuchungen .....	14
7.2.3.1	Biopsie-Aufarbeitung .....	14
7.2.3.2	Schnitte .....	14
7.2.3.3	Färbungen .....	14
7.2.3.3.1	Hematoxylin und Eosin (H.E.) .....	14
7.2.3.3.2	Trichrome .....	15
7.2.3.3.3	NADH .....	15
7.2.3.3.4	Congorot – alkaline Methode .....	15
7.2.4	Amyloid-Charakterisierung .....	15
7.2.4.1	Extraktion .....	15
7.2.4.2	SDS-PAGE und Western Blot .....	16
7.2.5	Mikroskopische Auswertung .....	16
7.2.6	Anti-C5-Antikörper-Therapieversuch .....	17
7.2.7	Statistische Auswertung .....	17
7.2.8	Bildbearbeitung .....	18
8	Ergebnisse .....	19
8.1	Allgemeines .....	19
8.1.1	Altersverteilung in den Mausgruppen .....	19
8.2	Klinische Ergebnisse .....	20
8.2.1	Fell .....	20
8.2.2	Spontanmotorik .....	20
8.2.3	Laufрад .....	21
8.2.4	Stäbchentest .....	21
8.2.5	Gittertest .....	22
8.2.6	Gewicht .....	22
8.3	Histologische Ergebnisse .....	24

8.3.1	Photographien .....	24
8.3.2	Statistische Auswertung .....	27
8.3.2.1	Fasersplitting.....	27
8.3.2.2	Zentralisierte Kerne.....	29
8.3.2.3	Nekrotische Fasern.....	31
8.3.2.4	Entzündliche Infiltrate.....	33
8.3.2.5	Fetteinlagerung.....	35
8.3.2.6	Kalibervarianzen .....	35
8.3.2.6.1	Minimalwert .....	36
8.3.2.6.2	Maximalwert .....	38
8.3.2.6.3	Mittelwert.....	40
8.4	Anti-C5-Therapieversuch .....	42
9	Diskussion .....	44
9.1	Diskussion der Methoden.....	44
9.1.1	Tierhaltung.....	44
9.1.2	Klinische Tests .....	45
9.2	Diskussion der Ergebnisse.....	51
9.2.1	Klinische Tests .....	51
9.2.2	Histologische Tests .....	55
9.2.3	Amyloid und Dysferlin.....	61
9.2.4	Anti-C5-Therapieversuch.....	61
9.3	Diskussion des Mausmodells.....	62
10	Anhang .....	73
10.1	Abbildungsverzeichnis .....	73
10.2	Tabellenverzeichnis .....	74
11	Danksagung .....	75
12	Lebenslauf.....	76
13	Eidesstattliche Erklärung .....	77

## **Widmung**

Diese Arbeit ist meinem Großvater, Prof. Dr. Dr. Helmut Arndt, der diese leider nicht mehr erleben durfte, sowie meinem Vater, Dr. Walter Vieweger, - beide keine Mediziner - gewidmet.

## 4 Abkürzungsverzeichnis

LGMD 2B	Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2B
SHIRPA	SmithKline Beecham Pharmaceuticals Harwell, MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit Imperial College School of Medicine at St Mary's Royal London Hospital, St Bartholomew's and the Royal London School of Medicine Phenotype Assessment
ab	Antibody
CK	Creatin Kinase
RNA	Ribonucleic Acid
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
DGC	Dystrophin-associated Glycoprotein Complex
MHC	Major Histocompatibility Complex
DAF	Decay-Accelerating Factor
SMAD	Ein zusammengesetzter Terminus, der von den Sma Genen (Caenorhabditis elegans) und dem Mad Gen (Drosophila melanogaster), das als intrazellulä- res Substrat für die Signalwege von TGF- $\beta$ und BMP fungiert, abgeleitet ist.
MAC	Membrane Attack Complex
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic Acid
H.E.	Hematoxylin & Eosin
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
SD	Standard Deviation
Anti-C5- AK	Anti-C5-Antikörper
GMC	German Mouse Clinic
EAMG	Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis
JAX	The Jackson Laboratories
ETn	Early Transposon
MMRRC	Mutant Mouse Regional Resource Centre

## **5 Einleitung**

### **5.1 Neuromuskuläre Erkrankungen**

Der Begriff „neuromuskuläre Erkrankungen“ umfasst eine Vielzahl unterschiedlicher Krankheitsentitäten. Dazu gehören die Erkrankungen der Motorneurone der Medulla oblongata und des Rückenmarks, der peripheren Nerven, der neuromuskulären Synapsen sowie der Herz- und / oder Skelettmuskulatur.

Erkrankungen der Motorneurone der Medulla oblongata führen zur Bulbärparalyse, die der  $\alpha$ -Neurone des Rückenmarks resultieren in den sehr heterogenen spinalen Muskelatrophien. Krankheiten der peripheren Nerven treten in Form von Neuropathien oder Neuritiden auf, bei der neuromuskulären Synapse zeigen sich Transmissionsstörungen oder neuromuskuläre Übertragungsstörungen. Als Skelett- und / oder Herzmuskelerkrankungen sind in diesem Zusammenhang Myopathien und Muskeldystrophien zu nennen.

Häufig werden die genetisch bedingten neuromuskulären Erkrankungen durch Mutationen ausgelöst, die zu veränderten Proteinen in Neuronen, am Myelin oder anderen neuronalen Strukturen, an Enzymen oder Strukturproteinen der Muskelzellen führen. Die Prävalenz neuromuskulärer Erkrankungen beträgt mindestens 1:1500.

### **5.2 Muskeldystrophien**

Kongenitale Myopathien und Muskeldystrophien stellen unter den Muskelerkrankungen eine diverse Gruppe dar. Sie werden durch gleichartige Beschwerden und physische Befunde gekennzeichnet. Myopathien werden durch Gendefekte in Genloci des kontraktile Apparats des Muskels ausgelöst. Sie zeichnen sich durch charakteristische statische, histochemische oder ultrastrukturelle Veränderungen in der Muskelbiopsie aus. Hingegen sind bei den Muskeldystrophien das Sarkolemm oder Stützproteine betroffen, was sich in einem Nachweis einer pathologischen, andauernden Muskeldegeneration und –regeneration äußert (1).

In dieser Arbeit wird der Fokus auf die Muskeldystrophien gelegt. Traditionell verstand man unter dieser Bezeichnung progressive, hereditäre, primär degenerative Muskelerkrankungen. Da mit molekularen Untersuchungsmethoden immer mehr Gendefekte identifiziert

werden können, ist dieser Begriff heute klarer definiert. Heute werden Muskeldystrophien als genetisch determinierte Erkrankungen definiert, die eine progressive Schwäche und Atrophie der Skelettmuskulatur bewirken (2). Zu dieser Gruppe zählen u.a. die Muskeldystrophien Duchenne und Becker, kongenitale Muskeldystrophien, X-chromosomale Dystrophien wie die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie und die Gliedergürtelmuskeldystrophien (LGMD).

### 5.2.1 Ätiologie

Das erste auf molekularer Ebene gefundene Substrat der Dystrophien war das Dystrophin-Protein. 1986 gelang es auf genetischer Ebene, mehrere Deletionen in der mit der Krankheit verbundenen Region Xp21 nachzuweisen (3), ein Jahr später wurde das dazugehörige Protein gefunden (4). Seither wurde eine Vielzahl an Strukturproteinen und Enzymen entdeckt, die bei Mutation in dem zugehörigen Gen zu einer Muskeldystrophie führen. Dabei ist der Primärdefekt unterschiedlich lokalisiert. So findet er sich z.B. am Sarkolemm, wenn das Dystrophin und Dystrophin-assoziierte Proteine betroffen sind. Die Funktion der betroffenen Proteine ist noch nicht in allen Fällen vollständig erforscht.

### 5.2.2 Gliedergürtelmuskeldystrophien

Die Gliedergürtelmuskeldystrophien sind eine genetisch und phänotypisch sehr heterogene Gruppe primär degenerativer Myopathien. Gemeinsam ist den LGMDs eine fortschreitende Schwäche der Extremitäten und der Gliedergürtel, eine stark erhöhte Serumkreatinkinase (CK) und die histologischen Merkmale einer nekrotisierenden Myopathie mit De- und Regeneration und Bindegewebsinfiltration ohne spezifische ultrastrukturelle Veränderungen (5,6). Weiter werden die LGMDs in Typ 1 (autosomal dominant) und 2 (autosomal rezessiv) mit jeweils verschiedenen Unterbezeichnungen - je nach mutiertem Gen - unterteilt.

### 5.2.3 Gliedergürtelmuskeldystrophie 2B

#### 5.2.3.1 Ätiologie

Die LGMD 2B wurde erstmalig 1994 definiert, als in zwei Familien aus unterschiedlicher ethnischer Herkunft die Gliedergürtelmuskeldystrophie mit einem Lokus auf Chromosom 2p13 in Verbindung gebracht werden konnte (7). Nur ein Jahr später konnte gezeigt werden, dass die distal betonte Miyoshi Myopathie ebenfalls auf eine Mutation in diesem Lokus zurückzuführen ist (8). In zwei großen Familien wurde daraufhin die Koexistenz beider Phänotypen gezeigt (9,10). Das betroffene Gen wurde 1998 identifiziert, und Mutationen in demselben wurden in Familien mit Miyoshi Myopathie (11) und mit LGMD 2B (12) beschrieben.

#### 5.2.3.2 Dysferlin

Das Genprodukt, Dysferlin, ist ein Protein mit sieben putativen C2-Domänen und einer C-terminalen transmembranösen Domäne. Es wird ubiquitär exprimiert und ist in der Peripherie der Muskelfasern lokalisiert. In der Immunfluoreszenz zeigt sich Dysferlin sowohl im Sarkolemm als auch in zytosolischen Vesikeln (12).

Die Dysferlin-RNA wird hauptsächlich in der Skelettmuskulatur exprimiert, kann aber auch in Herz und Plazenta nachgewiesen werden und wird schwach in Lunge, Leber, Nieren und Pankreas exprimiert. Dysferlin wurde bereits in dem Carnegie Stadium 15 oder 16 (embryonisches Alter fünf bis sechs Wochen) nachgewiesen, daher ist es in einer Entwicklungsstufe anwesend, in der es zur regionalen Differenzierung der Extremitäten kommt (13).

Zu den Ferlinen gehört auch das Myoferlin, das ebenso wie das Dysferlin besonders im Skelettmuskel exprimiert wird. Im Microarray-Genexpressionsprofil zeigt sich, dass Myoferlin-mRNA bei der Muskeldystrophie Duchenne stark erhöht ist (14), weshalb es eine Rolle bei der Membranreparatur spielen könnte (15). In den C2C12-Zellen, die ein murines Zellkulturmodell für die Muskelentwicklung darstellen, wird Myoferlin in elongierten Präfusionsmyoblasten exprimiert, während Dysferlin in hohen Konzentrationen erst nach der Fusion der Myoblasten zu Myotuben nachweisbar ist (16). Dieses unterschiedliche Expressionsmuster legt nahe, dass die Proteine auf besondere Funktionen spezialisiert sind. Das



Myoferlin könnte während der Myogenese wichtig sein, wohingegen Dysferlin reife Muskelfasern reparieren könnte. Ihre starke Homologie suggeriert, dass sie den Verlust des jeweils Anderen kompensieren könnten (15). Die biochemischen Daten unterstützen die Hypothese, dass die Ferline eine Rolle bei der Fusion innehaben. Für die erste C2-Domäne (C2A) von sowohl Dysferlin als auch Myoferlin wurde bewiesen, dass sie  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig Phosphatidylserin bindet. Bei einer Mutation, die mit der LGMD 2B assoziiert ist, der sog. V67D, wird diese Bindung gestört.

Bei Dysferlin-defizienten Patienten zeigen sich ultrastrukturell Plasmamembrandefekte, Veränderungen in der Basalmembran und abnormale papilläre Faserprojektionen. In vereinzelt lobulierten Fasern und Ringfasern findet sich eine myofibrilläre Desorganisation. Ein Verlust von Myofilamenten, Veränderungen der Z-Scheibe und andere myofibrilläre Veränderungen können in nekrotischen Fasern nachgewiesen werden. Zwei von fünf Patienten zeigten eine geringe perivaskuläre Infiltration mit mononukleären Zellen (17). Möglicherweise stellen die Plasmamembrandefekte, die kleinen subsarkolemmalen Vakuolen und die sich desintegrierenden papillären Projektionen eine frühe Implikation der Plasmamembran in der Pathogenese der Dysferlin-Defizienz dar. Der Ersatz des Plasmalemmes durch multiple Vesikelschichten und eine Verdickung der Basalmembran wäre eine Funktion, um die Muskelfaser vor einem exzessiven Einstrom extrazellulärer Flüssigkeit zu schützen.

C2-Domänen können Kalzium binden und so kalziumabhängige Signaltransduktionen vermitteln (11,17). Des Weiteren können C2-Domänen Phospholipide, Inositolpolyphosphate und intrazelluläre Proteine binden, mit Zellmembranen interagieren und Molekülverkehr, Vesikeltransport, Lipidmodifikationen und Proteinphosphorylierung vermitteln (17).

Die Liganden von Dysferlin sind noch nicht genau identifiziert. Die Interaktion mit Caveolin-3 scheint von Bedeutung zu sein (18), eine Assoziation mit Calpain 3 ist ebenfalls beschrieben worden (19).

Bei der Dysferlinopathie ist im Gegensatz zu DGC-Muskeldystrophien das Sarkolemm primär stabil (20). Daraus folgt, dass bei der Dysferlinopathie der Membranreparaturmechanismus fehlerhaft ist, da sich beim Färben mit Evan's Blue, einem membranundurchlässigen Farbstoff, Dysferlin-defiziente Zellen anfärben ließen.

Die Reparatur der Membran ist ein grundlegender zellulärer Mechanismus, der erforderlich ist, um Membranläsionen zu schließen. Da Skelettmuskelzellen unter physiologischen Bedingungen Kräften ausgesetzt sind, die häufig zu Membranläsionen führen (21,22), kommt es bei einem fehlerhaften Reparatursystem zur Faserdegeneration. Bansal et al. konnten weiterhin zeigen, dass Dysferlin-Anreicherungen im Bereich von Membranläsionen vorkommen und dass der Verschluss dieser Läsionen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Prozess ist (20). In Dysferlin-defizienten Fasern war diese  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Reparatur gestört. Daher ist wahrscheinlich, dass Dysferlin eine Rolle beim Membranfusionsschritt der Reparatur innehat, was durch die Anwesenheit mehrerer C2-Domänen in seiner Struktur und seine Homologie zu anderen bekannten Vesikelfusionsproteinen unterstrichen wird. Dysferlin, das auch auf den Vesikeln zu finden ist, soll Andocken und Fusion der Vesikel mit der Zellmembran vermitteln - entweder zusammen mit anderen Dysferlin-Molekülen oder unbekanntem proteinbindenden Partnern.

Dysferlin bindet unter physiologischen Bedingungen die Annexine A1 und A2. Annexine sind weit verbreitete  $\text{Ca}^{2+}$ - und Phospholipid-bindende Proteine, die eine wichtige Rolle beim Membranverkehr, bei transmembraner Kanalaktivität, Inhibition der Phospholipase  $A_2$  und Zell-Matrix-Interaktionen innehaben. Für die Annexine A1 und A2 konnte gezeigt werden, dass sie  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig intrazelluläre Vesikel und Lipidschollen an der zytosolischen Oberfläche der Plasmamembran aggregieren. Die Kollokalisierung von Dysferlin und den Annexinen ist im dysferlinopathen Muskel aufgehoben (23). Die Autoren schlagen vor, dass Dysferlin im Ruhezustand an der Plasmamembran sitzt, während Annexine A1 und A2 als Monomere oder Oligomere in der subsarkolemmalen Region sitzen, wo sie mit der zytoplasmatischen Region des Dysferlins reagieren können. Eine Membranläsion führt zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx entlang eines steilen Konzentrationsgradienten. Die erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration setzt eine Reaktionskaskade in Gang, die in der intrazellulären Vesikelaggregation und daraus in der Bildung eines hydrophoben Patches resultiert. Dieser Patch wandert zur Zellmembran und fusioniert mit ihr, um weiteren Zellschaden zu verhindern.

Bei einem Großteil der Biopsien Dysferlin-defizienter Muskeln sieht man eine starke Entzündungsreaktion, die sich in einer erhöhten MHC-Klasse-I-Expression und / oder Makrophagenreaktion und T-Lymphozyteninfiltration äußert (24). Ultrastrukturelle Studien

zeigten, dass die Makrophagen und T-Lymphozyten am Sarkolemm hafteten. Sarkolemm und Basalmembran zeigten sich verdickt und mehrschichtig. Des Weiteren fanden sich Löcher in der Plasmamembran, den Mikrovilli ähnliche Projektionen und Aggregate an amorphem elektronendichten Material. Subsarkolemmal fanden sich prominente Ansammlungen von Vesikeln, die wahrscheinlich vom Golgi-Apparat abstammen.

Eine Aktivierung der Komplementkaskade auf der Oberfläche nicht-nekrotischer Fasern konnte bei Patienten mit LGMD (25) sowie im Speziellen bei Patienten mit Dysferlinopathie (17) nachgewiesen werden. Bei den Patienten mit LGMD wurde ferner die Ablagerung von Membranangriffskomplexen gezeigt (25). In gesundem Gewebe wird einer überschießenden Komplementaktivierung mittels löslicher und membrangebundener Inhibitoren entgegengewirkt. Zu den membrangebundenen Faktoren gehören der „Decay-Accelerating Factor“ (DAF/CD55), Membran-Kofaktor (CD46) sowie CD59 (26). Sowohl in der Dysferlin-defizienten Maus (SJL/J, A/J, *Dysf*<sup>-/-</sup>) als auch bei Patienten mit LGMD 2B zeigte sich eine deutliche Downregulierung der Expression von CD55, wahrscheinlich bedingt durch eine Downregulierung des SMAD-Komplexes, der in der Promotorregion des CD55-Gens bindet. Dadurch sind die Muskelzellen nicht gegen die Komplementaktivierung geschützt, es kommt zur Bildung des Membranangriffskomplexes (C5b9-MAC) (27).

## 6 Herleitung der Aufgabe

In der AG Muskelkrankheiten ist ein Schwerpunkt der Forschung die Dysferlin-defiziente Muskeldystrophie. Dieser Schwerpunkt hat zu vielen Publikationen über Mutationen, zellbiologische und immunologische Veränderungen bei der DYSF-Muskeldystrophie geführt. So fand unsere Gruppe 2006 neue Sequenzvarianten bei Patienten mit einer Dysferlinopathie, die zu einem mRNA-Zerfall und einer möglichen fehlerhaften Fältelung von C2-Domänen führten. In dieser Untersuchung wurden zwei Mutationen identifiziert, die diese Proteinfaltung an der zweiten und der fünften C2-Domäne beeinflussen, sowie drei, die zu einem Verlust an nachweisbarem Dysferlin führen. Dabei zeigte sich, dass die fünfte C2-Domäne beim Transport von Dysferlin zum Sarkolemm eine wichtige Rolle spielt, da eine Mutation in diesem Bereich zu einer Ansammlung von Dysferlin innerhalb der Zelle führt (28). Diese Untersuchungen waren alle an humanem Skelettmuskel durchgeführt worden. Langfristig sind für therapierelevante wissenschaftliche Fragestellungen auch

geeignete Tiermodelle unbedingt notwendig. Diese Modelle müssen klinisch und histologisch gut charakterisiert sein. Um eine Grundlage für klinische und therapeutische Tests an einem Tiermodell zu haben, war die Aufgabe, ein Mausmodell für die Dysferlinopathie klinisch sowie histologisch genau zu charakterisieren. Für diese Aufgabe stehen prinzipiell mehrere verschiedene Mausmodelle zur Verfügung.

Ein murines Model für die Dysferlinopathie stellt die SJL/J-Maus dar. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine Anfälligkeit gegenüber induzierten Autoimmunerkrankungen und eine erhöhte Regenerationskapazität der Skelettmuskulatur aus. Zusätzlich entwickeln die Mäuse eine spontane Myopathie mit entzündlicher Komponente (29,30). Diese Myopathie zeigt das histologische Bild einer progressiven Muskeldystrophie mit degenerierenden und regenerierenden Fasern und einer fortschreitenden Fibrose (31). Primär sind die proximalen Muskelgruppen betroffen, während sich die distalen weniger betroffen zeigen.

Diese Myopathie wird autosomal rezessiv vererbt, das betroffene Gen befindet sich auf dem murinen Chromosom 6 auf einem Locus, der mit dem humanen Chromosom 2p13, dem Dysferlin-Gen, syntenisch ist. Im Western Blot zeigte sich eine markante Erniedrigung der Dysferlin-Werte auf 15% im Muskel der SJL/J-Maus im Vergleich zu Dysferlin-kompetenten Mäusen und Menschen. Es konnte eine Deletion in der letzten C2-Domäne identifiziert werden, die 171kb mRNA umfasst und in einer partiellen Elimination der C2E-Domäne resultiert (31).

Das murine Dysferlin-Gen besitzt eine >90%ige Homologie zum humanen Gen, wobei die meisten Unterschiede am 5'-Ende zu finden sind. In verschiedenen Geweben lassen sich unterschiedlich große Transkripts des Dysferlins nachweisen. So ist es im Skelett- und Herzmuskel 7kb groß, in Herz, Gehirn, Leber, Niere und Skelettmuskel wird noch eine 4kb Isoform gefunden, wogegen in fast allen untersuchten Mausgeweben noch weitere Isoformen von 2kb und 1.35kb nachweisbar waren. Ein Vergleich der murinen mit der humanen cDNA zeigte, dass die Deletion am Anfang des Exon 45 beginnt und das gesamte Exon umfasst. Durch Primer, die an das 3'- und das 5'-Ende des Exons binden, und Analyse der dadurch gewonnenen Sequenz, fand man eine 141kb umfassende Deletion der cDNA, die ein Tandem-Repeat betrifft, das die 3' Splicing Site verändert. Das bedeutet, dass es sich um eine Splice Site Mutation handelt, die auf dem cDNA-Level zu einer Deletion führt. Es wird vermutet, dass diese Mutation zu einem Exon Skipping führt, wodurch ein Teil der

C2E-Domäne fehlt. Da diese Domäne stark konserviert ist und in Proteininteraktionen beteiligt sein soll, könnte ein partieller Defekt der Domäne in einem instabilen Protein resultieren (32).

Da zur Untersuchung einer humanen Erkrankung idealerweise ein Modell mit einer natürlich auftretenden analogen Erkrankung bei der Maus herangezogen werden sollte (30), haben wir die SJL/J-Maus zur Charakterisierung ausgewählt.

## 7 Material und Methoden

### 7.1 Material

Tab. 1: Material und Bestellnummern.

<b>Mäuse</b>	
SJL/J	Charles River Laboratories, Strain Code 478
C57BL/6	Charles River Laboratories, Strain Code 027
<b>Biopsie-Aufarbeitung</b>	
Tragacanth-Pulver	Synopharm #226071-0002
Glycerin	Merck #1.040933.1000
Thymol	Synopharm #222575-0003]
Gum Tragacanth	10.5g Tragacanth-Pulver, 4.2ml Glycerin, wenige Krümel Thymol
Korkplättchen	Sigma
<b>Lösungsmittel</b>	
Formalin 4% pH 7	Herbeta-Arzneimittel #208289
Methanol 80, 100%	Merck #1.06009.2511
Ethanol vergällt 90, 100%	Herbeta-Arzneimittel #216925
Isopentan	Sigma Aldrich #277258-1l
Eisessig	Merck #1.00063.1011
Xylol reinst	Herbeta-Arzneimittel #219507
<b>Grundstoffe</b>	
Phosphotungstic Acid (=Wolframatophosphorsäure)	Merck #1.00583.0100
1N Natriumhydroxid	Merck #1.06498.1000
B-NADH, Grad III, Disodium Salt, 5mg/Fläschchen	Sigma #N-9410
Natriumchlorid	Merck #1.06404.1000
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck #1.06346.0500
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck #1.06579.0500
<b>Farbstoffe</b>	
Gill's Hematoxylin	Merck #1.05175.0500
Eosin gelblich	Merck #1345
Gomori's Trichrome	0.6g Chromotrope 2R, 0.3g Fast Green FCF, 0.6g Wolframatophosphorsäure, 1ml Eisessig und 100ml destilliertes Wasser, mit 1N Natriumhydroxid auf einen pH von 3.4 angehoben und vor jedem Gebrauch gefiltert
Chromotrope 2R	Sigma #C-3143
Fast Green FCF	Appllichem #A.1401.0010
Inkubationsmedium	1 Fläschchen B-NADH, Grad III, Disodium Salt, 5mg/Fläschchen, 2ml destilliertes Wasser, 1ml Saline, 1ml Phosphatpuffer
Nitro Blue Tetrazolium (200mg/100ml dH <sub>2</sub> O)	Sigma #N-6876
Modifiziertes Mayer's Hematoxylin	Merck #1.09249
<b>Puffer und Lösungen</b>	

Saurer Alkohol	1000ml 80% Methanol und 8ml Eisessig
Lithiumcarbonat gesättigt	Merck #1.05680.0250
Saline	0.85g Natriumchlorid auf 100ml destilliertes Wasser
Phosphatpuffer	19.5ml von 0.343g $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /25ml $\text{dH}_2\text{O}$ und 80.5ml von 1.410g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /100ml $\text{dH}_2\text{O}$ , mischen und auf einen pH von 7.4 justieren
Working Solution #1	20ml einer gesättigten Natriumchloridlösung, die erst kurz vor der Verwendung mit 200 $\mu\text{l}$ 1% NaOH versetzt werden
Working Solution #2	20ml Congorotlösung (0.2g Congorot und 100ml gesättigte Natriumchloridlösung [s.o.], gut gemischt und 24h gealtert), die erst kurz vor dem Gebrauch mit 200 $\mu\text{l}$ 1% NaOH versetzt werden
Gesättigte NaCl-Lösung	Aus 80ml absolutem Ethanol, 20ml $\text{dH}_2\text{O}$ und ~5g NaCl, gut durchmischt und 24h gealtert
Congorotlösung	0.2g Congorot und 100ml gesättigte NaCl [s.o.], gut gemischt und 24h gealtert
<b>Eindeckelmedien</b>	
Vitro-Clud	Langenbrinck #212014
Glycerol Gelatine	Merck #1.09242.0100
<b>Amyloidextraktion</b>	
Tris-HCl	Sigma-Aldrich T3253
Dithiothreitol	Sigma D9163
Ultra-Turrax T8-Homogenisator mit einem 58N-8G Dispersionsansatz	Windaus, IKA Labortechnik, Deutschland
Eppendorf-Zentrifuge 5403	Eppendorf, Deutschland
Elektrophorese Probenpuffer	150 mM Tris-HCl, 8 M Urea, 2,5%(w/v) Natriumdodecylsulphat (SDS), 20% (v/v) Glycerol, 10% (v/v) 2-b-Mercaptoethanol, 3% (w/v) Dithiothreitol, pH 6,8
Harnstoff (Urea)	Roth X999.1
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Roth 2326.1
Glycerol	Roth 3783.1
2-b-Mercaptoethanol	Sigma M7154
<b>SDS-PAGE &amp; Western Blot</b>	
Trenngel 4%	1.2ml 40% Acrylamid (Rotiphorese Roth), 4ml SDS Gelpuffer, 0ml Glycerol, 6.8ml Wasser, 120 $\mu\text{l}$ 10% Ammoniumpersulfat (Sigma-Aldrich A3678), 9 $\mu\text{l}$ Temed (Sigma T9281)
Sammelgel 16.5%	4.95ml 40% Acrylamid (Rotiphorese Roth), 4ml SDS Gelpuffer, 2ml Glycerol, 1.05ml Wasser, 120 $\mu\text{l}$ 10% Ammoniumpersulfat (Sigma-Aldrich A3678), 3 $\mu\text{l}$ Temed (Sigma T9281)
Coomassie Blau	Serva 17524
Polyvinylidin-Difluorid-Membran	Immobilon-PSQ; Porengröße 0,1 $\mu\text{m}$ ; Millipore, Bedford, MA, U.S.A.
Tank-Blotting-System	Bio-Rad Mini Protean3 Electrophoresis (165-3322)
Anti-Maus-SAA-Antikörper	Pineda
Tween-20	Sigma-Aldrich P9416
Milchpulver	Roth T145.2
Ziegen-Anti-Hasen-Antikörper (sekundärer AK)	DAKO D0487
BCIP/NBT	Pierce 34042

## 7.2 Methoden

### 7.2.1 Mäuse

Für unsere Testreihen verwendeten wir die SJL/J-Maus als zu untersuchenden Stamm und die C57BL/6-Maus als Kontrolle. Die Mäuse wurden in einem Alter von 4 Wochen bestellt.

### 7.2.2 Klinische Untersuchung

Im Altersabstand von zwei Wochen wurden die Tiere untersucht. Dabei orientierten wir uns bei der Auswahl der Tests am SHIRPA-Protokoll (33). Das SHIRPA besteht aus drei Phasen, wobei die ersten beiden eine detaillierte Phänotypeinschätzung ermöglichen und die dritte ein auf neurologische Defizite spezialisiertes Testverfahren darstellt.

Unsere Testbatterie bestand aus einer initialen Inspektion, danach folgten der Laufradtest, der Stäbchentest und der Gittertest. Anschließend wurde die Maus per Genickbruch getötet. Das Gewicht wurde bestimmt und Proben aus dem M. quadriceps femoris (quer aufgeblickt) und das Herz in toto (mit der Herzbasis nach unten orientiert aufgeblickt) entnommen.

Die Inspektion beinhaltete Fellqualität, Haltung, Beweglichkeit, Muskeltonus und Bewegungsart sowie Armut oder Reichtum an spontanen motorischen Reaktionen.

Beim Laufradtest wurde die Maus in ein Laufrad gesetzt und gezählt, wie viele Umdrehungen sie im Laufrad bewältigte.

Beim Stäbchentest wurde die Maus mit den Vorderpfoten an ein Stäbchen gehängt mit frei hängenden Hinterpfoten und Schwanz. Wir beobachteten, ob die Maus in der Lage war, die Hinterpfoten hochzuschwingen, um ihren Halt an dem Stäbchen zu stabilisieren, und wie lange sie sich an dem Stäbchen halten konnte.

Beim Gittertest wurde subjektiv beurteilt, mit wie viel Kraft sich die Maus an dem horizontalen Gitter gegen Zug durch den Untersucher festhalten konnte.

Von einer Maus aus jeder Gruppe wurde zur besseren Darstellung eine Videoaufzeichnung des Fortganges der Untersuchung gefertigt.



Tab. 2: Übersicht über die Qualität der klinischen Tests.

Subjektive klinische Tests	Objektive klinische Tests
Fellqualität	Laufradtest
Spontanmotorik	Stäbchentest
Muskeltonus	Gewicht
Gittertest	

## 7.2.3 Histologische Untersuchungen

### 7.2.3.1 Biopsie-Aufarbeitung

Die Gewebeproben der Mäuse haben wir mit Gum Tragacanth auf einem Korkplättchen montiert und erst in gefrorenem Isopentan und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufbewahrt.

### 7.2.3.2 Schnitte

Die Gewebelöcke wurden an einem Kryotom in 5 und 10µm dicke Proben geschnitten und auf Deckgläschen gezogen. Die Schnitte wurden im Tiefkühlfach aufbewahrt.

Es wurden jeweils zwei Schnitte pro Probe routinemäßig nach H.E., Trichrome, NADH und Congorot gefärbt.

### 7.2.3.3 Färbungen

#### 7.2.3.3.1 Hematoxylin und Eosin (H.E.)

Die Schnitte wurden in Formalin 4% buffered pH7 für 1min fixiert. Danach wurden sie 10-mal in destilliertes Wasser getaucht. Für die Kernfärbung benutzten wir Gill's Hematoxylin, in das die Schnitte für 30s eingetaucht wurden. Anschließend wurden die Schnitte 2min lang unter laufendem demineralisierten Wasser gespült, bis das Wasser klar war. Es folgten zwei Durchgänge à 10-mal Eintauchen in saurem Alkohol. Die Schnitte wurden dann 5-mal in gesättigtes Lithiumcarbonat eingetaucht und im Anschluss in 80%igem und 100%igem Methanol fixiert. Die Zytoplasmafärbung erfolgte mit Eosin gelblich, in dem die Schnitte 3min gefärbt wurden. Zum Waschen nach der Eosinfärbung wurden die Schnitte für drei Durchgänge je 10-mal in Ethanol vergällt 100% getaucht, bis keine Farbe mehr

abtropfte. Zum Schluss wurden die Schnitte mit drei Durchgängen Xylol reinst à 10-mal Eintauchen fixiert und dann mit Vitro-Clud auf einem Objektträger eingedeckelt.

#### 7.2.3.3.2 Trichrome

Für diese Färbung haben wir zuerst die Schnitte in gefiltertem Gill's Hematoxylin für 5min färben lassen. Anschließend wurden die Schnitte unter laufendem demineralisierten Wasser gespült, bis das abtropfende Wasser klar war. Die gespülten Schnitte wurden dann in Gomori's Trichrome 5min lang gefärbt. Es folgte die Differenzierung in 0.2%igem Eisessig, bis keine Farbe mehr abtropfte. Zum Schluss wurden die Schnitte in 95%igem (schnell) und 100%igem Ethanol dehydriert und in Xylol fixiert. Eingedeckelt wurden die Schnitte mit Vitro-Clud auf Objektträgern.

#### 7.2.3.3.3 NADH

Die Schnitte wurden für 30min bei 37°C in dem Inkubationsmedium und 5ml NBT bebrütet. Anschließend wurden die Schnitte mit 30%igem - 60%igem - 30%igem Aceton gespült, danach in destilliertem Wasser. Eingedeckelt wurden die Schnitte mit Glycerol Gelatine auf Objektträgern.

#### 7.2.3.3.4 Congorot – alkaline Methode

Die Schnitte wurden 30s lang in modifiziertem Mayer's Hematoxylin gefärbt und anschließend unter laufendem destillierten Wasser gespült. Die Schnitte wurden dann 10min lang in der Working Solution #1 inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte mit der Working Solution #2 10min lang gefärbt. Danach wurden sie schnell dreimal in je frischem absoluten Ethanol dehydriert und in Xylol fixiert. Eingedeckelt wurden die Schnitte auf Objektträgern mit Vitro-Clud.

### 7.2.4 Amyloid-Charakterisierung

#### 7.2.4.1 *Extraktion*

Das Amyloid wurde aus nicht fixierten Proben präpariert. Dabei wurde das Gewebe über Nacht in deionisiertem Wasser inkubiert und anschließend in fünf Volumina (w/v) beste-

hend aus 50mM Tris-HCl und 1 mM Dithiothreitol, pH 7.5, 2min lang mit dem Ultra-Turrax T8-Homogenisator und einem 58N-8G Dispersionsansatz homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 15min mit 11000 rpm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 2.5 Volumina des Elektrophorese-Probenpuffers gelöst, für 20min auf 90°C erhitzt und erneut 15min lang mit 11000 rpm zentrifugiert. Der das Protein enthaltende Überstand wurde durch die SDS-PAGE weiter aufgetrennt (34).

#### *7.2.4.2 SDS-PAGE und Western Blot*

Die Proteine wurden in Polyacrylamidgels (4% Sammelgel, 10% und 16.5% Trenngel) aufgetrennt und mittels Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht (35). Für den Western Blot wurden die Proteine von ungefärbtem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidindifluorid-Membran mittels des Tank-Blotting-Systems von Bio-Rad Laboratories nach Herstellerangaben übertragen. Die Immunfärbung der Proteine wurde mit einem polyklonalen Anti-Maus-SAA-Antikörper durchgeführt (36). Freie Bindungsorte wurden mit Tris-gepufferter Saline, der 0.05%igem Tween-20 und 5%igem Milchpulver zugesetzt worden waren, über Nacht bei Raumtemperatur geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über 60min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde gründlich mit Tris-gepufferter Saline gewaschen, der 0.05%igem Tween-20 zugesetzt worden war. Danach wurde der sekundäre Antikörper, ein biotinylierter Ziegen-Anti-Hasen-Antikörper in der Verdünnung 1:1000, dazugegeben und die Probe für 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Immunfärbung wurde mittels BCIP/NBT sichtbar gemacht.

#### *7.2.5 Mikroskopische Auswertung*

Die Schnitte wurden unter dem Mikroskop ausgewertet. Dabei wurde die Anzahl der Fasern mit zentralisierten Kernen, der nekrotischen Fasern sowie die Anzahl der Fasern, die Fasersplitting aufwiesen, bestimmt. Des Weiteren wurden jeweils der kleinste und der größte Faserdurchmesser im Querschnitt ausgemessen. Subjektiv wurden die Fett- und Bindegewebeinlagerung sowie die entzündliche Infiltration bewertet. Für diese Bestimmungen eignete sich am besten die 20-fache Vergrößerung der Trichrome-Färbung. Von

allen Färbungen wurden in verschiedenen Vergrößerungen (4/10x, 20x, 40x, 100x) Photographien angefertigt.

Tab. 3: Übersicht über die Qualität der histologischen Methoden.

Subjektive histologische Tests	Objektive histologische Tests
Entzündliches Infiltrat	Zentralisierte Kerne
Fett- und Bindegewebeinlagerung	Nekrotische Fasern
	Fasersplitting
	Faserdurchschnitt

### 7.2.6 Anti-C5-Antikörper-Therapieversuch

Auf der Basis der durchgeführten Beobachtungen an den SJL/J-Mäusen wählten wir das Alter zwischen der 22. und 26. Lebenswoche für eine therapeutische Intervention, da in diesem Zeitfenster ein starker Anstieg der nekrotischen Fasern im Muskelgewebe der SJL/J-Mäuse zu verzeichnen war. Insgesamt wurden 54 Mäuse untersucht. Davon erhielten sechs Mäuse keine Therapie. Intraperitoneale Injektionen des Anti-Maus-C5-Antikörpers (n=21), der Isotypenkontrolle Maus-IgG1-Antikörper (n=21) oder von Albumin (n=6) von je einer Dosierung von 40mg/kg Körpergewicht wurden alle drei Tage über vier Wochen durchgeführt. Danach wurden Biopsien von allen Tieren entnommen und die Anzahl der nekrotischen Fasern bestimmt. Zur Objektivierung wurden die Muskelschnitte (n=54) durch zwei Untersucher blind ausgewertet. Pro Schnitt wurden 300 Fasern ausgezählt, <1% nekrotische Fasern wurden als milde Abnormalität eingestuft, wogegen  $\geq 1\%$  nekrotische Fasern als dystrophe Veränderung gewertet wurden.

### 7.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung des Programms SPSS for Windows Version 13.0.0 durchgeführt. Dabei wurde für die objektiven Tests (zentralisierte Kerne, nekrotische Fasern, Fasersplitting, Faserdurchmesser) eine parametrische Auswertung vorgenommen, da trotz geringer Fallzahlen von einer Gauß'schen Verteilung dieser Merkmale in einer großen Population auszugehen ist.

Zur Ermittlung der Signifikanzen wurden der Mann-Whitney- respektive der T-Test verwendet. Bei Anwendung des T-Tests wurde die Prüfung auf Homoskedastizität mittels Levene Test durchgeführt.

Der Anti-C5-Antikörper-Therapieversuch wurde mittels Chi-Quadrat-Test ausgewertet.

#### 7.2.8 Bildbearbeitung

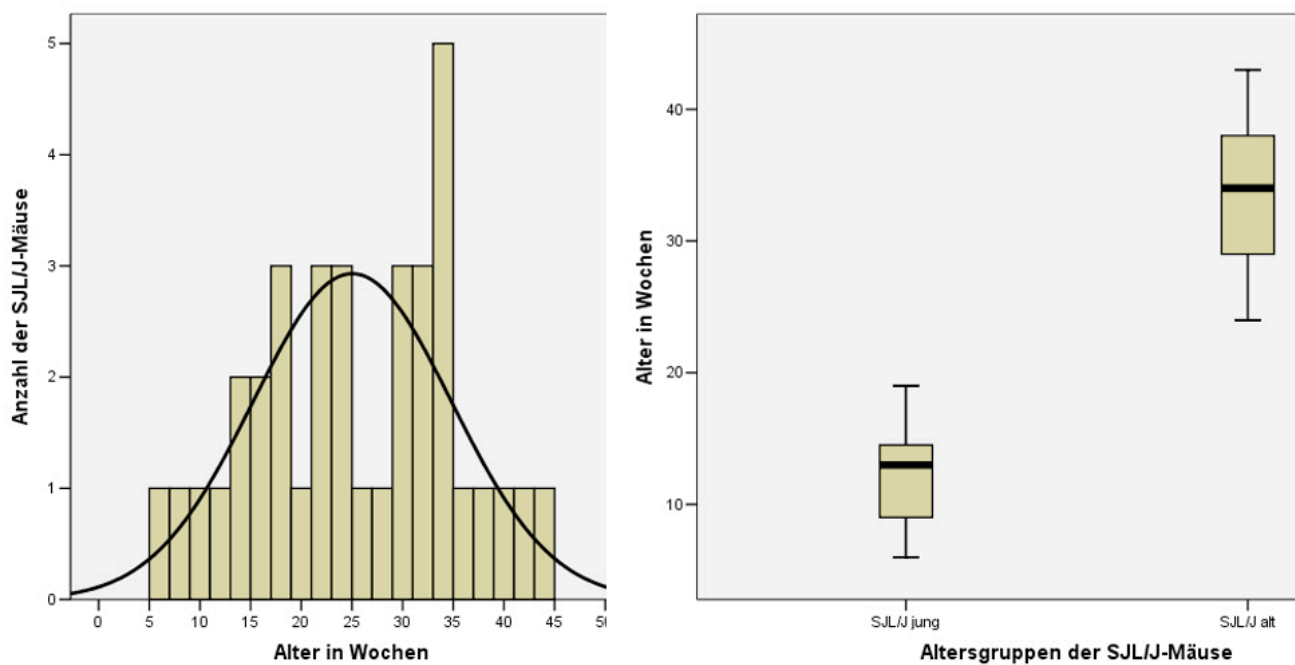
Die Bildbearbeitung wurde mit Adobe Photoshop for Windows Version 7.0 durchgeführt.

## 8 Ergebnisse

### 8.1 Allgemeines

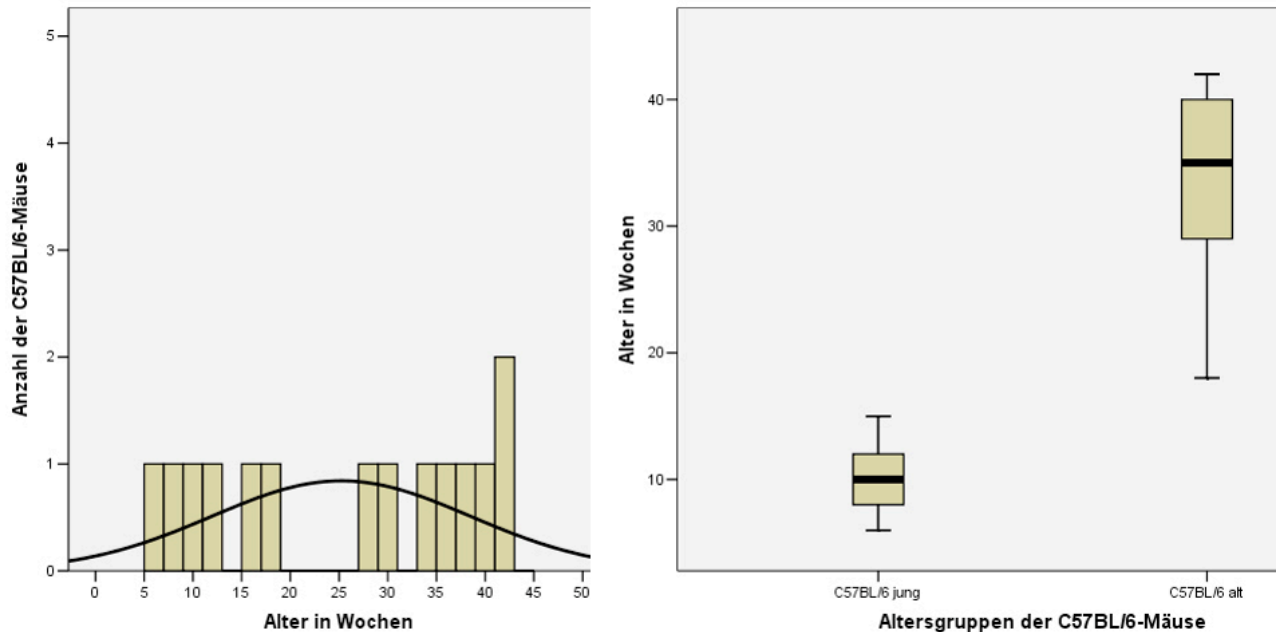
Insgesamt wurden 50 Mäuse untersucht. Davon waren 36 Tiere vom Stamm SJL/J und 14 vom Stamm C57BL/6. Die Mäuse sind in verschiedenen Altersstufen untersucht worden.

#### 8.1.1 Altersverteilung in den Mausgruppen



**Abb. 1: Altersverteilung der untersuchten SJL/J-Mäuse.**

Das durchschnittliche Alter der untersuchten SJL/J-Mäuse betrug 25.03 Wochen (SD 9.802). Das jüngste Tier wurde mit sechs Wochen untersucht, das älteste mit 43 Wochen.



**Abb. 2: Altersverteilung der untersuchten C57BL/6-Mäuse.**

Das durchschnittliche Alter der Kontrollmäuse betrug 25.21 Wochen (SD 13.273). Die jüngste untersuchte Maus aus dieser Gruppe war sechs Wochen alt, die älteste 42 Wochen.

## 8.2 Klinische Ergebnisse

### 8.2.1 Fell

Von den acht SJL/J-Mäusen in der alten Gruppe (Alter 31 bis 43 Lebenswochen) hatten sieben ein struppiges und eine ein glattes Fell. Bei ihren jüngeren Artgenossen (Alter 6 bis 15 Lebenswochen) zeigten sieben von sieben glattes Fell. Die Kontrollmäuse hatten ungeachtet ihres Alters alle ein glattes Fell.

### 8.2.2 Spontanmotorik

Bei der Spontanmotorik zeigten alle Kontrollen (14/14) eine normale Kraft und einen normalen Muskeltonus. Von den jungen SJL/J-Mäusen zeigten nur drei eine normale Spontanmotorik, vier zeigten eine Reduktion von Kraft und Muskeltonus. Von den älteren SJL/J-Mäusen zeigten alle acht eine Reduktion von Kraft und Muskeltonus, sie waren insgesamt

verlangsamt und bewegungsärmer, ihre Haltung am Becken eingeknickt. Für die Kontrollmäuse und die alten SJL/J-Mäuse kann aufgrund der Variablenkonstanz keine Signifikanz berechnet werden. Die Kontrollmäuse waren gesund und die alten SJL/J-Mäuse alle pathologisch auffällig. Für die jungen SJL/J-Mäuse ergibt sich im Chi-Quadrat eine Signifikanz von  $p=0.705$ , das heißt nicht signifikant, da sich die Mäuse in gesunde und kranke mit fast gleichen Zahlen teilten.

Tab. 4: Resultate der klinischen Tests in Abhängigkeit von Alter und Genetik.

### 8.2.3 Laufrad

Nur wenige Mäuse lernten, das Laufrad zu benutzen. Daher war dieser Test nicht verwertbar. Die Ergebnisse stellten sich wie in Tab. 4 festgehalten dar.

### 8.2.4 Stäbchentest

Im Stäbchentest zeigten die älteren SJL/J-Mäuse eine bessere Leistung als ihre jungen Artgenossen und sogar als die Kontrollmäuse gleich welchen Alters. Dabei erreichten alte SJL/J-Mäuse häufiger eine stabile Position. Beim Vergleich junger und alter

Mausstamm	Alter Wochen	Fellqualität	Kraft/Tonus	Laufrad (in U)	Stäbchentest	Gittertest
SJL/J (jung)	6	Glatt	Normal	-	-	-
	8	Glatt	Patholog.	-	1-2s gefallen	Mäßig
	10	Glatt	Normal	10	>35s stabil	Gut
	12	Glatt	Patholog.	-	0s gefallen	Schwach
	13	Glatt	Patholog.	14	5s gefallen	Mäßig
	14	Glatt	Patholog.	4+5	-	Gut
SJL/J (alt)	15	Glatt	Normal	2	-	Gut
	31	Struppig	Patholog.	-	10s gefallen	Schwach
	33	Struppig	Patholog.	1	7s gefallen	Schwach
	34.1	Glatt	Patholog.	-	6s stabil	Gut
	34.2	Struppig	Patholog.	-	-	Schwach
	34.3	Struppig	Patholog.	-	10s stabil	Mäßig
	37	Struppig	Patholog.	-	20s gefallen	Mäßig
C57BL/6 (jung)	39	Struppig	Patholog.	5+12	30s gefallen	Schwach
	43	Struppig	Patholog.	-	-	Gut
	6	Glatt	Normal	-	-	Gut
	8	Glatt	Normal	-	-	Gut
	10	Glatt	Normal	-	13s stabil	Gut
	12	Glatt	Normal	-	-	Gut
	18	Glatt	Normal	-	15s stabil	Gut
	27	Glatt	Normal	-	26s gefallen	Gut
C57BL/6 (alt)	29	Glatt	Normal	-	10s gefallen	Gut
	33	Glatt	Normal	-	-	Gut
	35	Glatt	Normal	-	8s gefallen	Gut
	37	Glatt	Normal	-	8s gefallen	Gut
	39	Glatt	Normal	-	2s gefallen	Mäßig
	40	Glatt	Normal	-	3s gefallen	Gut
	41	Glatt	Normal	-	-	Gut
	42	Glatt	Normal	-	-	Gut



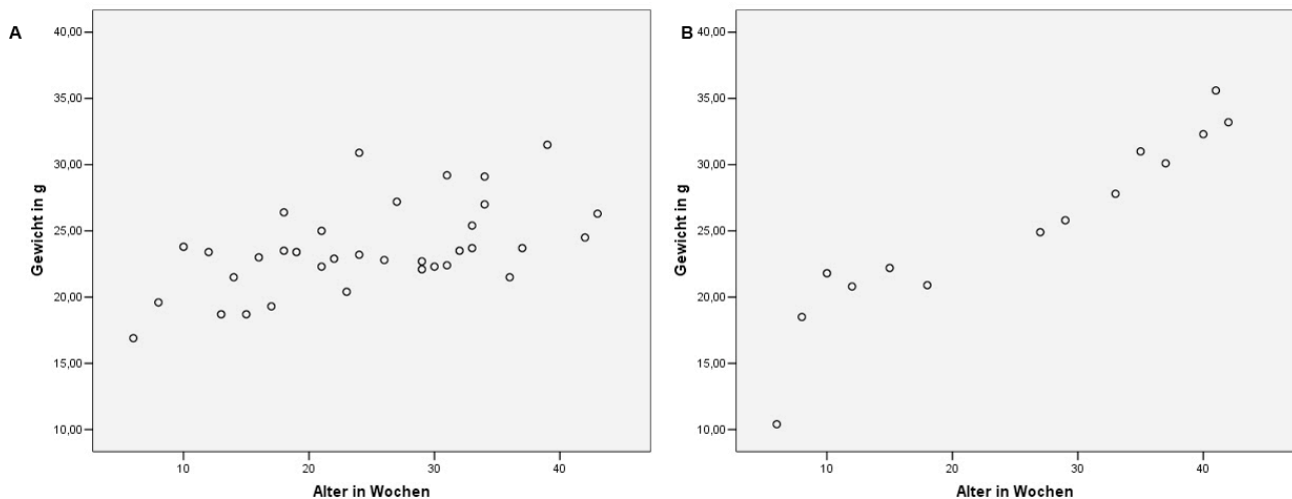
Kontrollen deutete sich an, dass junge C57BL/6-Mäuse, wenn der Test durchführbar war, eher eine Stabilität erreichten als ihre alten Stammesgenossen. Insgesamt reichen die Daten jedoch für eine abschließende Beurteilung nicht aus.

### 8.2.5 Gittertest

Hier deutete sich an, dass SJL/J-Mäuse insgesamt schlechter abschnitten als die Kontrollen gleich welchen Alters. Ein Trend, dass junge SJL/J-Mäuse mehr Kraft in diesem Test als ihre alten Stammesgenossen aufwiesen, kann ebenfalls interpretiert werden.

### 8.2.6 Gewicht

Beim Gewicht zeigte sich sowohl bei den SJL/J-Mäusen als auch bei den Kontrollmäusen eine Korrelation mit dem Alter. Bei den SJL/J-Mäusen lag jedoch eine weitere Streuung der Werte vor als bei den C57BL/6-Mäusen.

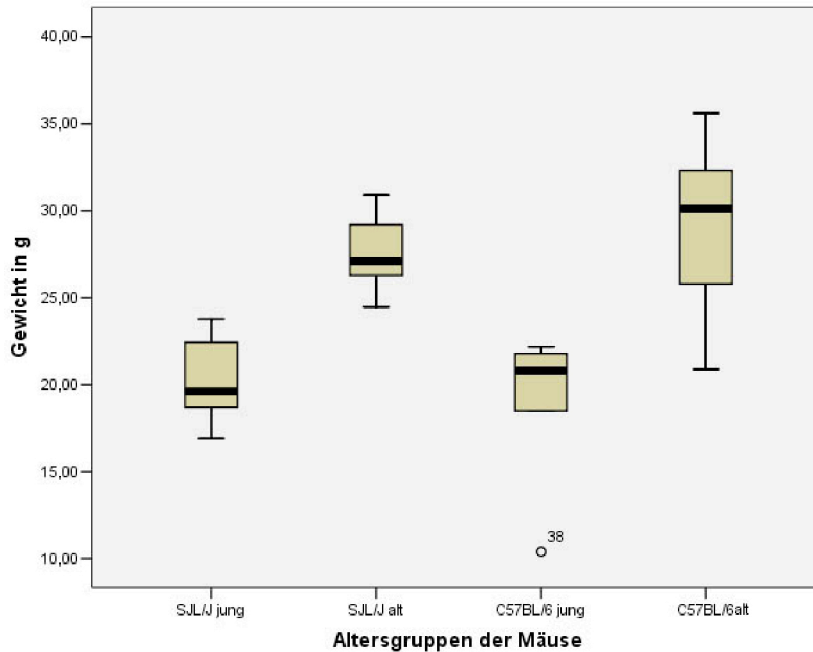


**Abb. 3: Auftragung des Gewichts über der Zeit (Alter); (A) SJL/J-Mäuse, (B) C57BL/6-Mäuse.**

Daher stellte sich der Zusammenhang zwischen Alter und Gewicht bei den Kontrollmäusen deutlicher dar.

Für die jungen SJL/J-Mäuse ergab sich einen Mittelwert für das Gewicht von 20.3714g (95% Konfidenzintervall 17.9706-22.7723g) mit einer Standardabweichung von  $SD=2.59597g$ . Bei den älteren SJL/J-Mäusen betrug der Mittelwert 26.2429g (95% Konfi-

denzintervall 23.2205-29.2652g), wobei die Standardabweichung bei  $SD=3.26795g$  lag. Die jungen Kontrollen erreichten einen Mittelwert von 19.1000g (95% Konfidenzintervall 14.4284-23.7716g) bei einer Standardabweichung von  $SD=4.45152g$ . Bei ihren älteren Stammesgenossen stieg der Mittelwert auf 30.0875g (95% Konfidenzintervall 26.9862-33.1888g), die Standardabweichung betrug hier  $SD=3.70962g$ .



**Abb. 4: Verteilung der Gewichtswerte in den verschiedenen Gruppen.**

Die Mittelwerte unabhängiger Stichproben wurden anhand des T-Testes auf Signifikanz verglichen.

Beim Vergleich junger und alter SJL/J-Mäuse ergab der Levene-Test eine Signifikanz von  $p=0.635$ , weshalb im T-Test die Signifikanz für Varianzgleichheit  $p=0.003$  gewertet wurde. Der Unterschied junger SJL/J-Mäuse mit ihren gleichaltrigen Kontrollen ergab im T-Test eine Signifikanz für Gleichheit der Varianzen von  $p=0.534$ , der Wert im Levene-Test betrug  $p=0.444$ . Wurden alte Mäuse beider Gruppen verglichen, ergab der Wert im Levene-Test  $p=0.694$ , weshalb im T-Test die Signifikanz für Varianzgleichheit von  $p=0.054$  beachtet wurde. Der Vergleich junger und alter C57BL/6-Mäuse erzielte im Levene-Test eine Signifikanz von  $p=0.904$ , weshalb im T-Test der Wert für Varianzgleichheit von  $p=0.000$  gewertet wurde.

Daraus folgt, dass alte SJL/J-Mäuse signifikant schwerer waren als ihre jungen Stammesgenossen. Ebenso verhielt es sich bei den Kontrollen. In beiden Fällen waren die Unterschiede hoch signifikant. Der Unterschied zwischen jungen SJL/J-Mäusen und ihren gleichaltrigen Kontrollen ergab keinen signifikanten Unterschied. Der Gewichtsunterschied zwischen alten Tieren beider Gruppen überschritt das Signifikanzniveau lediglich um 0.04, wobei die SJL/J-Mäuse weniger wogen als ihre gesunden Kontrollen. Möglicherweise wäre mit einer größeren Stichprobe hier eine Signifikanz erreicht worden.

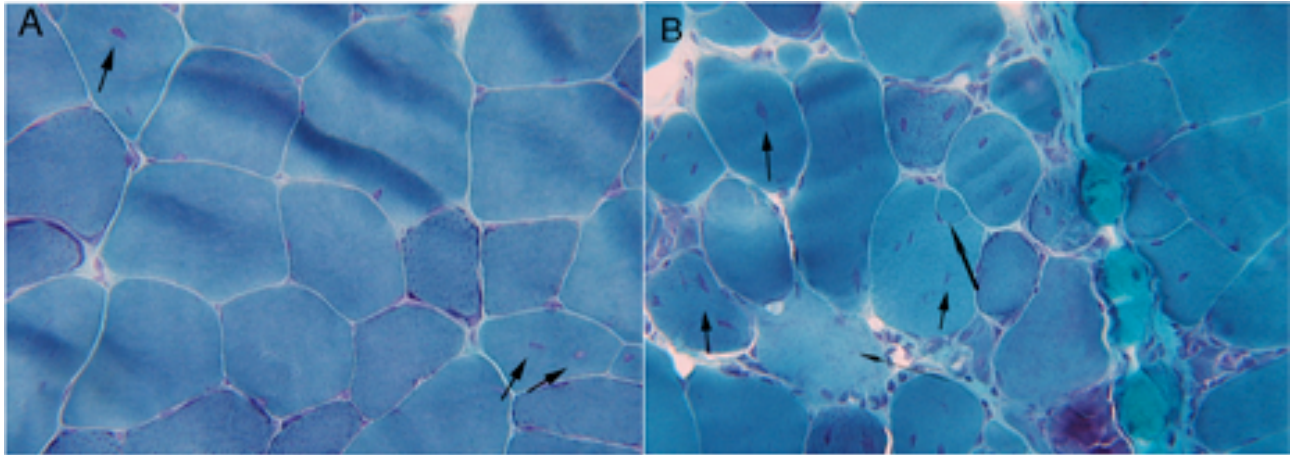
### **8.3 Histologische Ergebnisse**

Es wurden histologische Schnitte in der Trichrome-Färbung in 20-facher Vergrößerung ausgewertet und die Anzahl der Ereignisse (Fasersplittings, zentralisierte Kerne, nekrotische Fasern) pro 100 Fasern festgehalten. Zusätzlich wurde die Faserkalibervarianz gemessen, indem der Minimal- und der Maximalwert der Durchmesser der angeschnittenen Fasern bestimmt wurden. Fett- und Bindegewebeinlagerung sowie entzündliches Infiltrat wurden subjektiv mit Werten von 0 (kein Infiltrat / keine Fetteinlagerung) bis 3 (starkes Infiltrat / starke Fetteinlagerung) beschrieben.

#### 8.3.1 Photographien

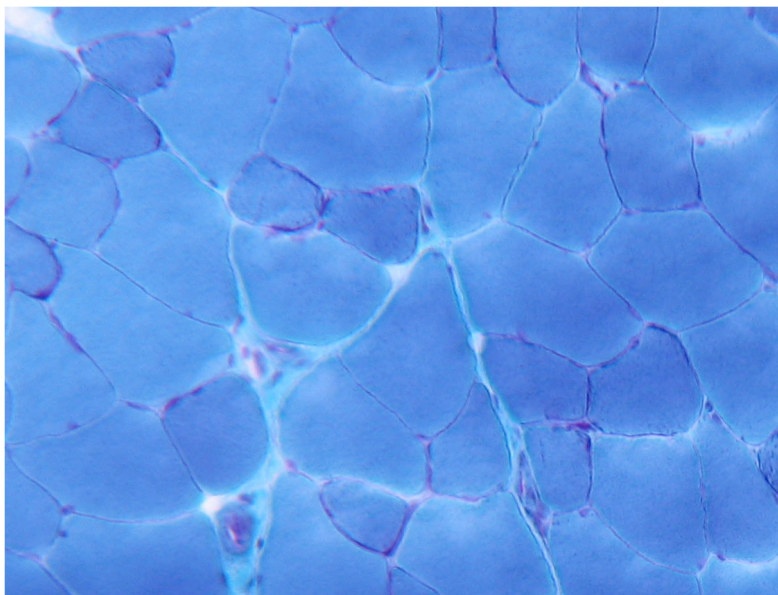
Im Vergleich war mikroskopisch schon ein qualitativer Unterschied zwischen den SJL/J-Mäusen und Kontrollen sowie jungen und alten SJL/J-Mäusen erkennbar.

Wie man in Abb. 5 (A) sehen kann, zeigt die junge SJL/J-Maus nur wenige histologische Pathologien. Es sind vereinzelt zentralisierte Kerne (Pfeile) erkennbar, Fasersplitting liegt hier nicht vor. Die Fasern zeigen wenig Kalibervarianz, es liegt kein entzündliches Infiltrat und keine Fett- oder Bindegewebsvermehrung vor.



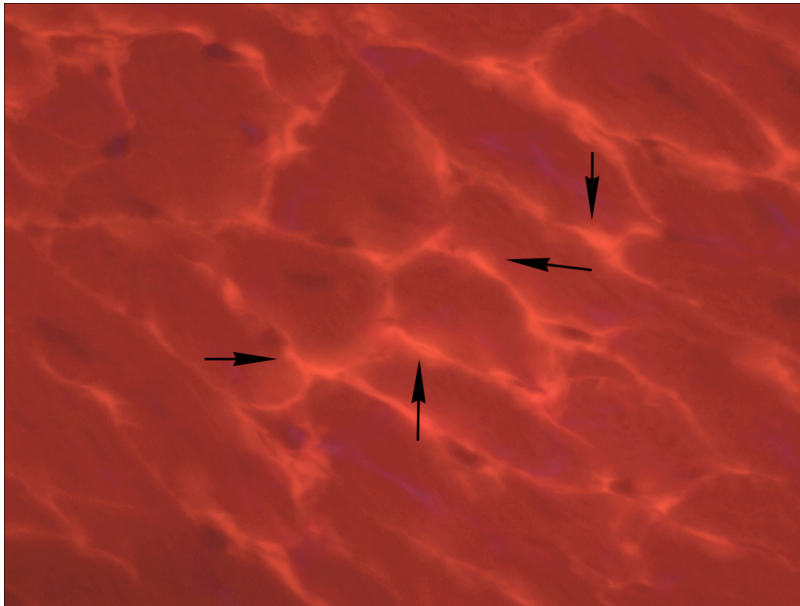
**Abb. 5: Trichrome-Färbung des Muskels von SJL/J-Mäusen. (A) 12 Wochen alte Maus. Die Pfeile markieren zentralisierte Kerne. (B) 33 Wochen alte Maus. Die kleinen dicken Pfeile zeigen zentralisierte Kerne, der dicke lange Pfeil zeigt Fasersplitting, der dünne lange Pfeil eine nekrotische Faser.**

Die ältere SJL/J-Maus weist alle Pathologien einer Muskeldystrophie auf, angefangen bei einem erheblichen entzündlichen Infiltrat sowie Fett- und Bindegewebeinlagerung. Die Faserkaliber variieren hier beträchtlich. Des Weiteren finden sich multiple zentralisierte Kerne, gelegentlich Fasersplitting und auch nekrotische Fasern. Damit ist der Skelettmuskel der älteren Maus histologisch dystroph.



**Abb. 6: Trichrome-Färbung des Muskels einer 33 Wochen alten C57BL/6-Maus.**

Der Skelettmuskel der gleichaltrigen Kontrollmaus weist eine normale Altersdegeneration mit einer leichten Kalibervarianz auf. Es liegt jedoch weder ein entzündliches Infiltrat vor noch ist es zu einer Fett- oder Bindegewebsvermehrung gekommen. Pathologien finden sich hier selten. In Abb. 6 sieht man weder zentralisierte Kerne noch nekrotische Fasern oder Fasersplitting.



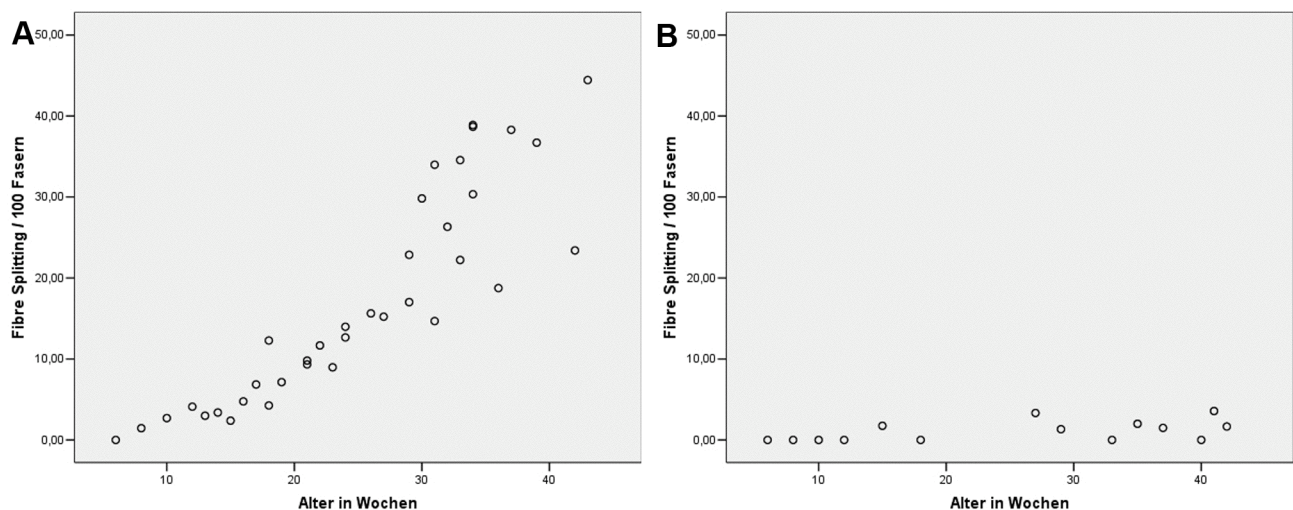
**Abb. 7: Congorotfärbung des Herzmuskels einer 43 Wochen alten SJL/J-Maus. Die Pfeile zeigen auf das Amyloid.**

Die SJL/J-Mäuse zeigten eine weitere Besonderheit. In den Herzschnitten fanden sich ab der 27. Lebenswoche in der Congorotfärbung unter der Rhodaminoptik Amyloidablagerungen. Diese fanden sich weder in den Herzschnitten der Kontrollen noch in den Skelettmuskelschnitten beider Gruppen. Die Abb. 7 zeigt die Congorotfärbung des Herzmuskelschnittes einer 43 Wochen alten SJL/J-Maus. Zwischen den Zellen sieht man unter der Rhodaminoptik fluoreszierendes Material. Das Amyloid wurde extrahiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Hieraus ergab sich, dass es sich um AA-Amyloid handelte.

### 8.3.2 Statistische Auswertung

Da das Fasersplitting am besten als histologischer Marker mit der Krankheitsschwere über die Zeit korrelierte, wurden für die Auswertung der Daten nur die Mäuse eingeschlossen, die im Fasersplitting Werte zeigten, die um mindestens eine Standardabweichung vom Mittelwert abwichen. Die Kontrollmäuse wurden altersentsprechend den SJL/J-Mäusen gegenübergestellt. Das ergab 15 Mäuse in der SJL/J-Gruppe, davon sieben in der jungen Untergruppe und acht in der alten Untergruppe. Die C57BL/6-Gruppe bestand aus 14 Tieren, hier waren sechs in der jungen Untergruppe und acht in der alten Untergruppe.

#### 8.3.2.1 Fasersplitting



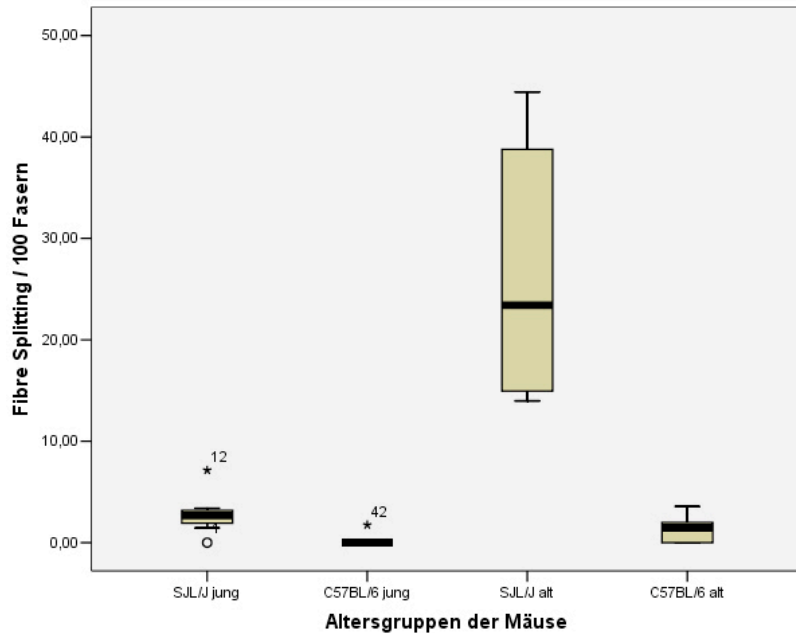
**Abb. 8: Auftragung der Fasersplittings pro 100 Fasern über der Zeit (Alter). (A) SJL/J-Mäuse. (B) C57BL/6-Mäuse.**

Die Ergebnisse aller SJL/J-Mäuse streuten bei einer Auftragung über der Zeit (Alter) um eine Gerade, was einen linearen Zusammenhang suggeriert. Bei den C57BL/6-Mäusen ergab sich keine Abhängigkeit in diesem Merkmal.

Für die junge SJL/J-Gruppe ergab sich ein Mittelwert für das Fasersplitting von 2.4314 Fasersplittings/100 Fasern (95% Konfidenzintervall 1.1793-3.6836). Die Standardabweichung betrug  $SD=1.35390$ . Der Mittelwert in der alten SJL/J-Gruppe lag bei 36.9838 Fasersplittings/100 Fasern (95% Konfidenzintervall 33.4802-40.4873) mit einer Standardabweichung von  $SD=4.19079$ . In den Kontrollgruppen fanden sich insgesamt sehr wenig



Fasersplittings. So lag der Mittelwert der jungen C57BL/6-Gruppe bei 0.2917 Fasersplittings/100 Fasern (95% Konfidenzintervall -0.4581-1.0414) mit einer Standardabweichung von  $SD=0.71443$ . Bei der alten C57BL/6-Gruppe betrug der Mittelwert 1.6725 Fasersplittings/100 Fasern (95% Konfidenzintervall 0.5688-2.7762), die Standardabweichung lag bei  $SD=1.32019$ .



**Abb. 9: Verteilung der Fasersplittingwerte in den verschiedenen Gruppen.**

Des Weiteren wurden die Gruppen darauf getestet, ob diese Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant sind. Dabei wurden junge und alte SJL/J-Mäuse, junge SJL/J- und junge C57BL/6-Mäuse, alte SJL/J- und alte C57BL/6-Mäuse sowie junge und alte C57BL/6-Mäuse miteinander verglichen.

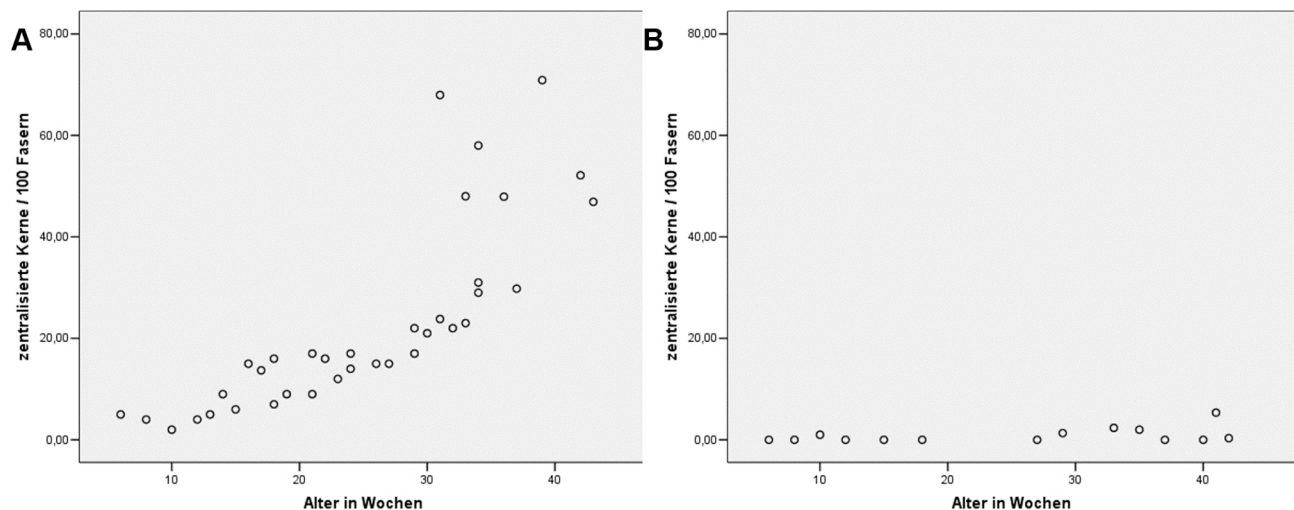
Es wurden die Mittelwerte unabhängiger Stichproben anhand des T-Testes verglichen.

Beim Vergleich der jungen und alten SJL/J-Gruppen ergab sich im Levene-Test eine Signifikanz von  $p=0.061$ , weshalb im T-Test der Wert für Varianzgleichheit beachtet wurde, der eine Signifikanz von  $p=0.000$  aufwies. Für den Vergleich der jungen SJL/J-Gruppe mit der jungen Kontrollgruppe lag die Signifikanz im Levene-Test bei  $p=0.218$ , daher wurde im T-Test die Signifikanz von  $p=0.005$  für die Gleichheit der Varianzen gewertet. Die Signifikanz im Levene-Test von  $p=0.044$  bei den alten Mausgruppen führte

zu einer Signifikanz der Unterschiede im T-Test für die Ungleichheit der Varianzen von  $p=0.000$ . Beim Vergleich der Werte der jungen C57BL/6-Gruppe mit denen der alten C57BL/6-Gruppe ergab sich im Levene-Test der Varianzgleichheit eine Signifikanz von  $p=0.221$ , weshalb im T-Test die Signifikanz für Varianzgleichheit von  $p=0.040$  gewertet wurde.

Daraus folgt, dass alte SJL/J-Mäuse signifikant mehr Fasersplittings/100 Fasern aufwiesen als ihre jungen Stammesgenossen und die gleichaltrigen Kontrollen. Junge SJL/J-Mäuse zeigten signifikant mehr Fasersplittings als gleichaltrige C57BL/6-Mäuse. Auch der Vergleich junger und alter C57BL/6-Mäuse ergab einen signifikanten Unterschied, der allerdings nicht hoch signifikant war.

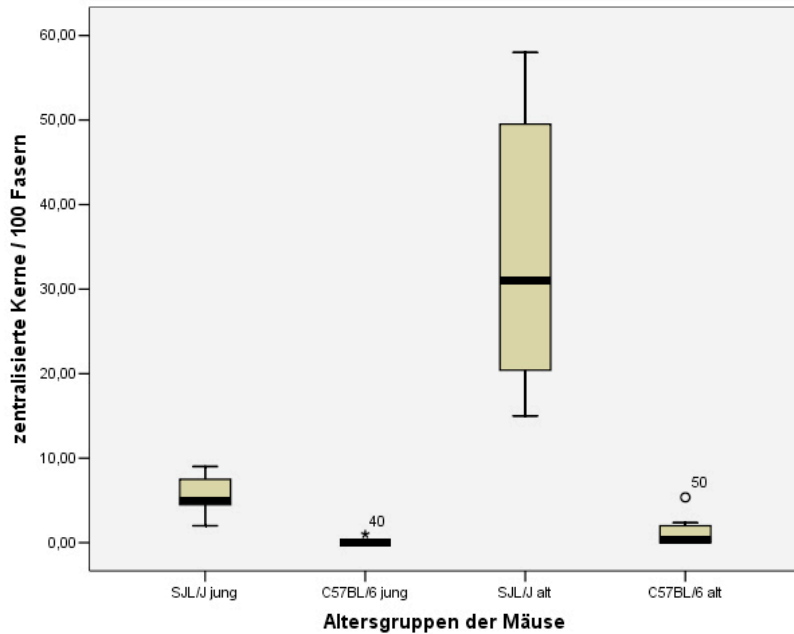
### 8.3.2.2 Zentralisierte Kerne



**Abb. 10: Auftragung der zentralisierten Kerne pro 100 Fasern. (A) SJL/J-Mäuse. (B) C57BL/6-Mäuse.**

Auch bei der Auftragung der Anzahl der zentralisierten Kerne pro 100 Fasern über der Zeit ergab sich bei den SJL/J-Mäusen eine Korrelation zum Alter.





**Abb. 11: Verteilung der Anzahl an zentralisierten Kernen pro 100 Fasern in den einzelnen Gruppen.**

Der Mittelwert lag in der jungen SJL/J-Gruppe bei 5.0000 zentralisierten Kernen/100 Fasern (95% Konfidenzintervall 3.0021-6.9979). Die Standardabweichung betrug hier  $SD=2.16025$ . Bei den älteren SJL/J-Mäusen ergab der Mittelwert 47.6938 zentralisierten Kernen/100 Fasern (95% Konfidenzintervall 33.5469-61.8406), wobei die Standardabweichung bei  $SD=16.92165$  lag. Bei den jungen Kontrollmäusen fand sich der Mittelwert bei 0.1667 zentralisierten Kernen/100 Fasern (95% Konfidenzintervall -0.2618-0.5951). In dieser Gruppe betrug die Standardabweichung  $SD=0.40825$ . Der Mittelwert der älteren C57BL/6-Mäuse lag etwas höher bei 1.4213 zentralisierten Kernen/100 Fasern (95% Konfidenzintervall -0.1258-2.9683), die Standardabweichung war hier bei  $SD=1.85049$  angesiedelt.

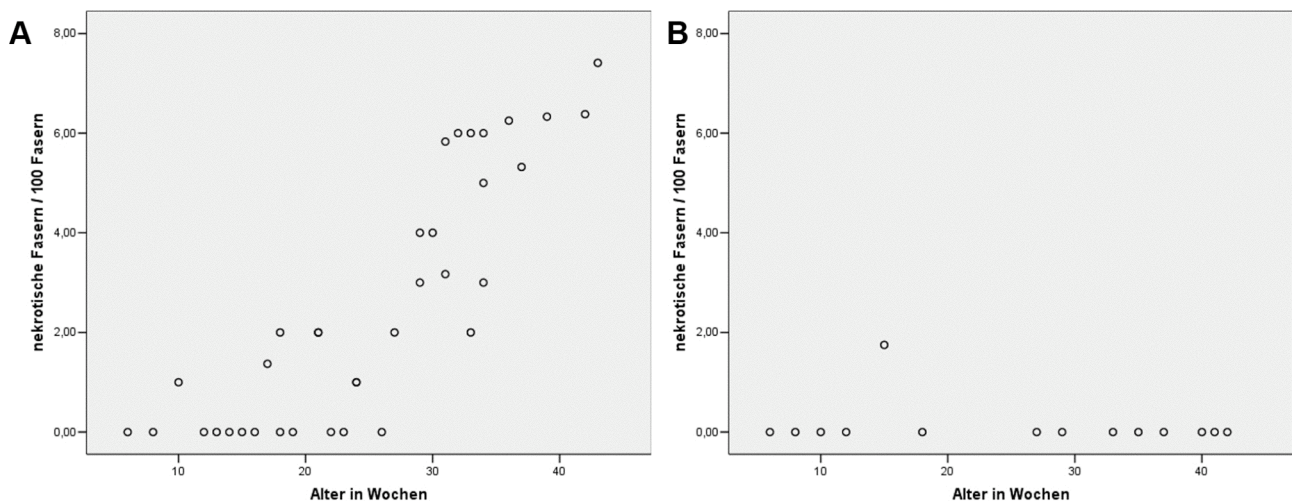
Bei der Untersuchung der Unterschiede der Gruppen in der Anzahl der zentralisierten Kerne pro 100 Fasern auf Signifikanz wurde wie bei den Fasersplittings verfahren.

Beim Vergleich der jungen SJL/J-Gruppe mit ihren alten Stammesgenossen ergab sich eine Signifikanz im Levene-Test von  $p=0.003$ , daher wurde im T-Test die Signifikanz für Varianzenungleichheit von  $p=0.000$  gewertet. Wenn man die Mittelwerte der jungen SJL/J-Mäuse mit denen der gleichaltrigen Kontrollen vergleicht, ergibt sich im Levene-Test ein

Wert von  $p=0.095$ , im T-Test wurde daher der Wert für die Gleichheit der Varianzen mit einer Signifikanz von  $p=0.000$  genommen. Die Signifikanz des Levene-Tests zwischen den Mittelwerten der alten Mausgruppen betrug  $p=0.002$ , im T-Test lag die Signifikanz der Varianzenungleichheit bei  $p=0.000$ . Der Vergleich der jungen mit den alten C57BL/6-Mäusen ergab eine Signifikanz im Levene-Test von  $p=0.044$ , daher beachteten wir im T-Test den Wert für Varianzenungleichheit mit einer Signifikanz von  $p=0.101$ .

Daraus folgt, dass die Unterschiede zwischen alten SJL/J-Mäusen und ihren jungen Stammesgenossen sowie gleichaltrigen Kontrollen hoch signifikant waren. Auch die jungen SJL/J-Mäuse hatten hoch signifikant mehr zentralisierte Kerne als gleichaltrige C57BL/6-Mäuse. Der Unterschied zwischen jungen und alten Kontrollen war nicht signifikant.

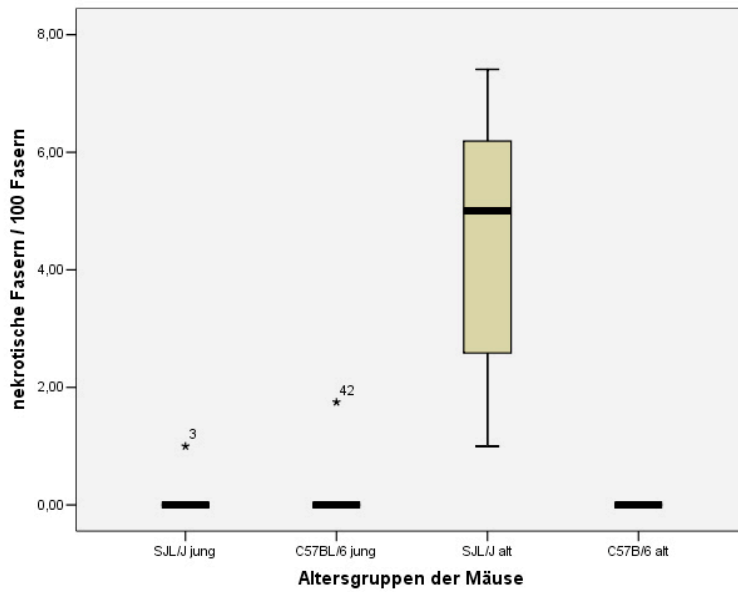
### 8.3.2.3 Nekrotische Fasern



**Abb. 12: Die Auftragung der nekrotischen Fasern pro 100 Fasern über der Zeit (Alter). (A) SJL/J-Mäuse. (B) C57BL/6-Mäuse.**

Die Anzahl der nekrotischen Fasern pro 100 Fasern korrelierte bei den SJL/J-Mäusen grob mit dem Alter.

Bei den Kontrollen kann man keine derartige Beziehung erkennen, nekrotische Fasern kommen in dieser Gruppe selbst im hohen Alter selten vor. In unserer Kontrollgruppe gab es nur eine Maus, die nekrotische Fasern aufwies. Der Rest zeigte in diesem Parameter keine Pathologien.



**Abb. 13: Verteilung der Anzahl an nekrotischen Fasern pro 100 Fasern in den verschiedenen Gruppen.**

Der Mittelwert der jungen SJL/J-Gruppe lag bei 0.1429 nekrotischen Fasern/100 Fasern (95% Konfidenzintervall -0.2067-0.4924) mit einer Standardabweichung von  $SD=0.37796$ . Bei den alten SJL/J-Mäusen betrug der Mittelwert 5.6113 nekrotische Fasern/100 Fasern (95% Konfidenzintervall 4.5453-6.6772). Die Standardabweichung lag hier  $SD=1.27500$ . Die jungen Kontrollmäuse zeigten einen Mittelwert von 0.2917 nekrotischen Fasern/100 Fasern (95% Konfidenzintervall -0.4581-1.0414). Die Standardabweichung betrug dabei  $SD=0.71443$ . Da die Anzahl der nekrotischen Fasern in der alten C57BL/6-Gruppe konstant bei 0.000 nekrotischen Fasern/100 Fasern lag, wurden diese zwar in die Boxplots mit aufgenommen, jedoch in anderen Ausgaben weggelassen.

Die Untersuchung der Unterschiede der Gruppen in der Anzahl der nekrotischen Fasern pro 100 Fasern auf Signifikanz wurde wie in den vorangegangenen Untersuchungen durchgeführt.

Der Vergleich junger und alter SJL/J-Mäuse erbrachte dabei eine Signifikanz im Levene-Test von  $p=0.086$ , weshalb im T-Test die Signifikanz der Varianzgleichheit von  $p=0.000$  gewertet wurde. Bei der Untersuchung der Unterschiede zwischen jungen SJL/J-Mäusen und ihren gleichaltrigen Kontrollen ergab im Levene-Test einen Wert von  $p=0.276$ , weshalb im T-Test der Wert für die Gleichheit der Varianzen mit einer Signifikanz von  $p=0.640$

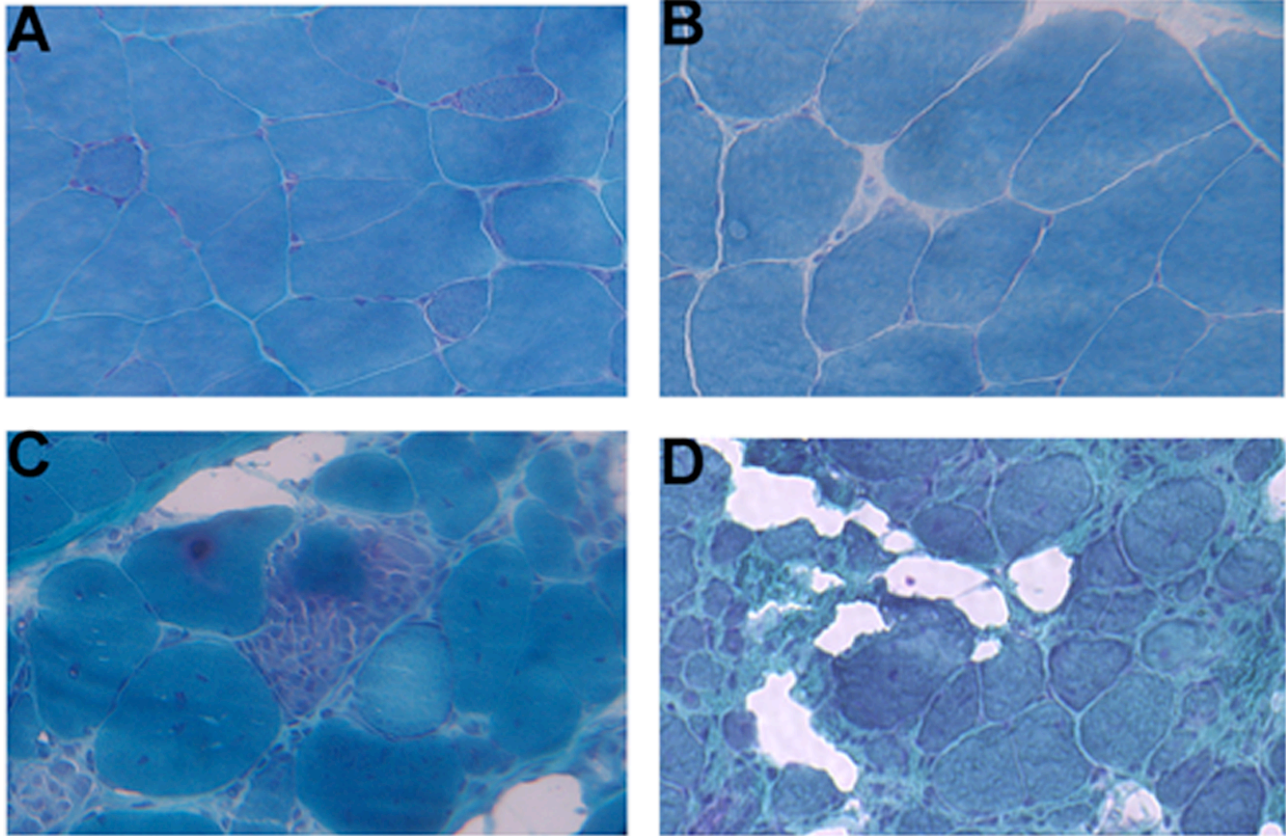
beachtet wurde. Die Signifikanz des Levene-Tests bei der Untersuchung des Unterschiedes zwischen alten SJL/J-Mäusen und alten Kontrollen ergab eine Signifikanz von  $p=0.012$ , die Signifikanz für Varianzenungleichheit im T-Test betrug  $p=0.000$ . Dagegen lag die Signifikanz der Ungleichheit der Varianzen im T-Test - bei einem Wert im Levene-Test von  $p=0.013$  - beim Vergleich junger und alter C57BL/6-Mäuse bei  $p=0.363$ .

Damit ist der Unterschied der Mittelwerte der nekrotischen Fasern zwischen alten und jungen SJL/J-Mäusen hoch signifikant. Gleiches gilt für den Vergleich alter Mäuse beider Stämme. Der Vergleich junger Mäuse beider Stämme sowie junger und alter Kontrollmäuse ergab keine signifikanten Werte.

#### *8.3.2.4 Entzündliche Infiltrate*

Die Stärke der entzündlichen Reaktion wurde in den Trichrome-gefärbten Schnitten anhand einer Ordinalskala mit Bewertungspunkten von 0 bis 3 bewertet. Dabei handelt es sich um eine subjektive Vergleichseinschätzung.

Abb. 14 zeigt Beispiele für die Einstufung der Biopsien. Bild (A) zeigt ein Muskelgewebe, das sowohl für die Fetteinlagerung als auch für das entzündliche Infiltrat mit dem Wert 0 bzw. kein Infiltrat und keine Fetteinlagerung bewertet wurde. Bild (B) zeigt eine Histologie, die für beide Merkmale den Wert 1 bzw. geringe Pathologien aufwies. Die Biopsie unten links (C) zeigt einen dystrophen Muskel, der in beiden Belangen den Wert 2 bzw. mittelgradig erhielt. Die letzte Histologie (D) zeigt beide Merkmale in maximaler Ausprägung, die mit dem Wert 3 bzw. schwer bezeichnet wurde.



**Abb. 14: Beispiele für die Bewertung von entzündlichem Infiltrat und Fetteinlagerung. (A)-(D) Trichrome-Färbungen des M. quadriceps femoris verschieden alter Mäuse aus beiden Gruppen. (A) Muskelschnitt einer 6 Wochen alten C57BL/6-Maus. (B) Muskelhistologie einer 31 Wochen alten C57BL/6-Maus. (C) Muskelhistologie einer 31 Wochen alten SJL/J-Maus. (D) Dystrophes Muskelgewebe einer 43 Wochen alten SJL/J-Maus.**

Die Ergebnisse wurden mittels SPSS und dem Mann-Whitney-Test ausgewertet. Der Vergleich der jungen und alten SJL/J-Mäuse ergab eine exakte Signifikanz von  $p=0.97$ . Bei der Gegenüberstellung der jungen Tiere beider Stämme erhielten wir eine exakte Signifikanz von  $p=0.010$ . Wurden die alten Tiere beider Stämme verglichen, ergab der Mann-Whitney-Test eine exakte Signifikanz von  $p=0.000$ . Der Vergleich der Kontrollmäuse bezüglich der Infiltrate ergab kein signifikantes Ergebnis, die exakte Signifikanz betrug hier  $p=0.518$ .

Daraus folgt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen jungen und alten SJL/J-Mäusen bezüglich entzündlicher Infiltrate bestand. Der Unterschied junger Tiere beider Stämme war signifikant, der zwischen alten Tieren hoch signifikant. Zwischen jungen und alten Kontrollmäusen war kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

Tab. 5: Resultate der Untersuchung auf entzündliches Infiltrat und Fetteinlagerung in Abhängigkeit von Genetik und Alter.

Mausstamm	Alter (Wochen)	Infiltrate	Fetteinlagerung
SJL/J (jung)	6	0	0
	8	2	1
	10	2	3
	12	2	1
	13	1	2
	14	2	0
	15	3	3
SJL/J (alt)	31	2	2
	34.1	3	2
	34.2	2	2
	34.3	2	2
	37	2	3
	39	3	2
C57BL/6 (jung)	6	0	0
	8	0	0
	10	0	0
	12	0	1
	18	0	0
	27	0	0
C57BL/6 (alt)	29	0	1
	33	0	0
	35	1	0
	37	1	1
	39	0	1
	40	0	2
	41	0	1
	42	0	2

### 8.3.2.5 Fetteinlagerung

Auch diese Qualität wurde anhand einer Ordinalskala mit den Werten 0 bis 3 eingestuft. Die Ergebnisse wurden mit SPSS und dem Mann-Whitney-Test ausgewertet. Für den Vergleich junger und alter SJL/J-Mäuse ergab dieser Test eine exakte Signifikanz  $p=0.209$ . Die Gegenüberstellung junger Mäuse beider Stämme lieferte eine exakte Signifikanz von  $p=0.073$ . Wurde der Mann-Whitney-Test mit den Werten der alten Tiere beider Stämme durchgeführt, ergab dies eine Signifikanz von  $p=0.002$ . Wurden hingegen junge und alte C57BL/6-Mäuse verglichen, ergab dies eine exakte Signifikanz von  $p=0.147$ .

Daraus folgt, dass lediglich zwischen alten SJL/J-Mäusen und gleichaltrigen Kontrollen ein hoch signifikanter Unterschied bestand. Alle anderen Unterschiede waren nicht signifikant.

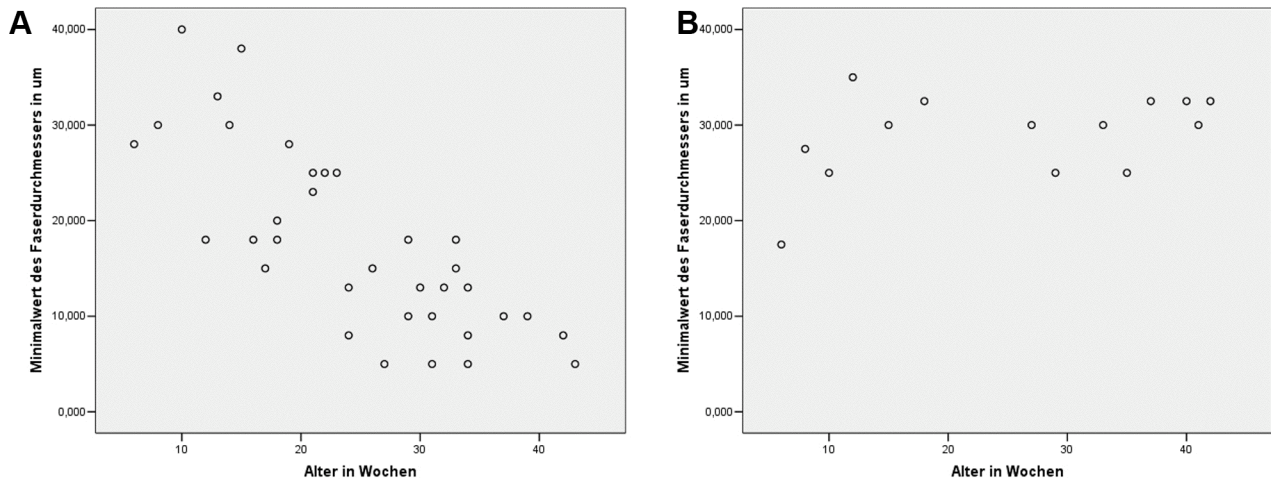
### 8.3.2.6 Kalibervarianzen

Um die Kalibervarianzen festzustellen, das heißt wie sehr sich die Durchmesser einzelner Fasern in einem Muskel unterscheiden, wurden jeweils der kleinste und der größte Durchmesser mikroskopisch bestimmt. Zusätzlich wurde der Mittelwert der Faserdurchschnitte berechnet.



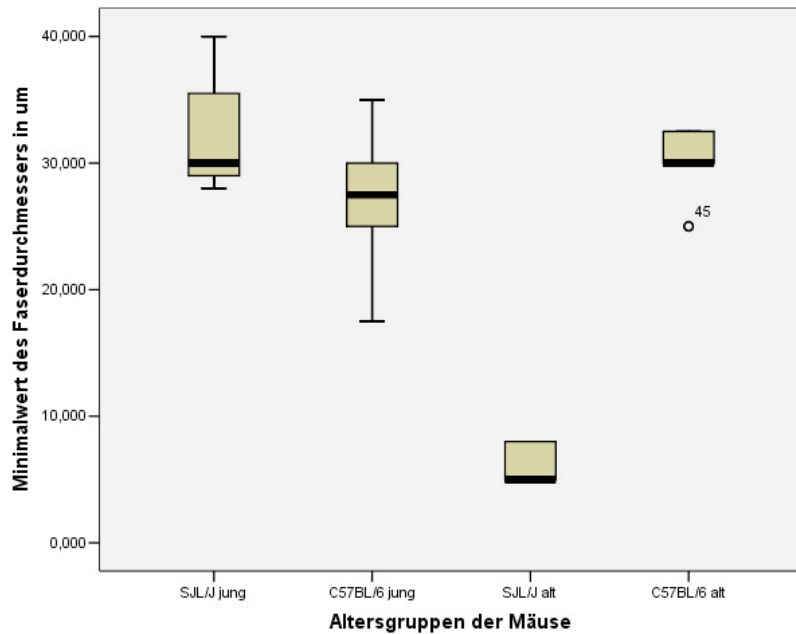
### 8.3.2.6.1 Minimalwert

Bei den SJL/J-Mäusen war beim Minimalwert ein abnehmender Trend im Lauf der Zeit zu erkennen. Dagegen ließ sich bei den Kontrollen keine derartige Tendenz erkennen, die Werte gruppierten sich um keine erkennbare Gerade.



**Abb. 15: Veränderung des Minimalwertes in Abhängigkeit vom Alter. (A) SJL/J-Mäuse. (B) C57BL/6-Mäuse.**

Bei den jungen SJL/J-Mäusen ergab sich ein Mittelwert von  $31.000\mu\text{m}$  (95% Konfidenzintervall  $24.30950\text{-}37.69050\mu\text{m}$ ), wobei die Standardabweichung  $SD=7.234178\mu\text{m}$  betrug. Bei den alten SJL/J-Mäusen lag der Mittelwert mit  $9.87500\mu\text{m}$  (95% Konfidenzintervall  $6.31577\text{-}13.43423\mu\text{m}$ ) sehr viel niedriger als bei den jungen Stammesgenossen. Die Standardabweichung lag bei  $SD=4.257347\mu\text{m}$ . Die jungen Kontrollmäuse lagen mit einem Mittelwert von  $27.91667\mu\text{m}$  (95% Konfidenzintervall  $21.40157\text{-}34.43177\mu\text{m}$ ) in einem ähnlichen Bereich wie die jungen SJL/J-Mäuse. Hierbei betrug die Standardabweichung  $SD=6.208194\mu\text{m}$ . Bei den alten C57BL/6-Mäusen fand sich der Mittelwert bei  $29.68750\mu\text{m}$  (95% Konfidenzintervall  $27.08241\text{-}32.29259\mu\text{m}$ ) und damit ebenfalls in der gleichen Region wie junge SJL/J-Mäuse und junge C57BL/6-Mäuse, bei einer Standardabweichung von  $SD=3.116059\mu\text{m}$ . Damit liegen allein die älteren SJL/J-Mäuse außerhalb dieses Bereiches.



**Abb. 16: Verteilung der minimalen Durchmesser in den einzelnen Mausgruppen.**

Bei der Untersuchung der Unterschiede im minimalen Durchmesser wurde wie o.g. vorgegangen.

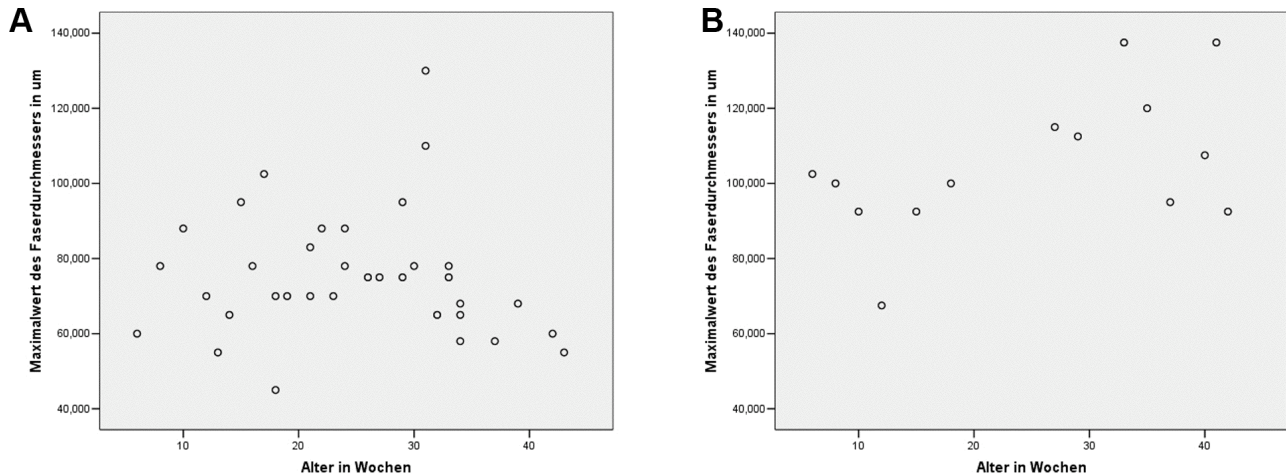
Beim Vergleich junger und alter SJL/J-Mäuse betrug die Signifikanz im Levene-Test der Varianzgleichheit  $p=0.277$ , daher wurden im T-Test die Werte für die Gleichheit der Varianzen genommen. Die Signifikanz betrug hier  $p=0.000$ . Bei der Untersuchung der Unterschiede zwischen jungen SJL/J-Mäusen und gleichaltrigen Kontrollen betrug im Levene-Test die Signifikanz  $p=0.816$ , weshalb im T-Test die Werte für die Gleichheit der Varianzen gewertet wurden. Hier lag die Signifikanz bei  $p=0.432$ . Beim Vergleich alter Mäuse beider Gruppen lag die Signifikanz im Levene-Test bei  $p=0.652$ , die Signifikanz im T-Test betrug für die Gleichheit der Varianzen  $p=0.000$ . Die Signifikanz im Levene-Test beim Vergleich junger und alter Kontrollmäuse fiel auf  $p=0.157$ , im T-Test wurde daher die Signifikanz für die Gleichheit der Varianzen gewertet, die bei  $p=0.495$  lag.

Bei der Betrachtung der Unterschiede ergaben sich lediglich hoch signifikante Werte beim Vergleich alter SJL/J-Mäuse mit ihren jungen Stammesgenossen und gleichaltrigen Kontrollen. Alle anderen Werte waren nicht signifikant.



### 8.3.2.6.2 Maximalwert

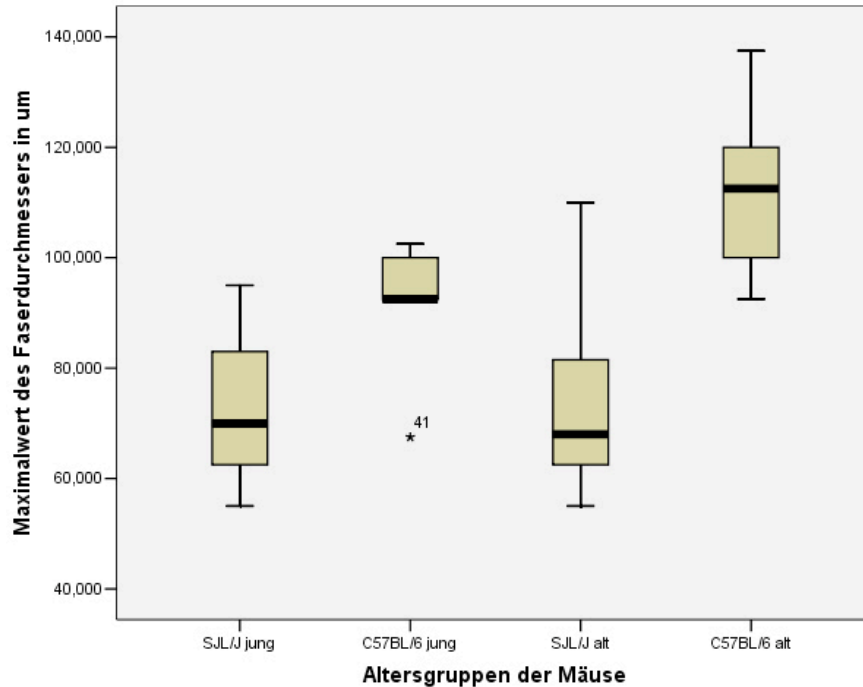
Beim maximalen Durchmesser war weder bei den SJL/J-Mäusen noch bei den C57BL/6-Mäusen eine Abhängigkeit vom Alter zu erkennen.



**Abb. 17: Auftragung der maximalen Durchmesser über der Zeit (Alter). (A) SJL/J-Mäuse. (B) C57BL/6-Mäuse.**

Der Mittelwert der maximalen Faserdurchmesser bei den jungen SJL/J-Mäusen lag bei einem Wert von  $73.000\mu\text{m}$  (95% Konfidenzintervall  $59.38664-86.61336\mu\text{m}$ ) mit einer Standardabweichung von  $SD=14.719601\mu\text{m}$ . Bei den alten SJL/J-Mäusen lag der Mittelwert mit  $72.12500\mu\text{m}$  (95% Konfidenzintervall  $51.80614-92.44386\mu\text{m}$ ) im gleichen Bereich. Die Standardabweichung betrug hier  $SD=24.304247\mu\text{m}$ . Bei den jungen Kontrollmäusen betrug der Mittelwert  $92.50000\mu\text{m}$  (95% Konfidenzintervall  $78.91802-10608198\mu\text{m}$ ) mit einer Standardabweichung von  $SD=12.942179\mu\text{m}$ . Der Mittelwert der alten C57BL/6-Mäuse lag bei  $114.68750\mu\text{m}$  (95% Konfidenzintervall  $100.53686-128.83814\mu\text{m}$ ), ihre Standardabweichung bei  $SD=16.926179\mu\text{m}$ . Damit sind die Mittelwerte der Kontrollen in beiden Gruppen größer als bei den SJL/J-Mäusen.

Im Boxplot stellten sich die Verhältnisse wie folgt dar.



**Abb. 18: Verteilung der maximalen Faserdurchmesser in den verschiedenen Mausgruppen.**

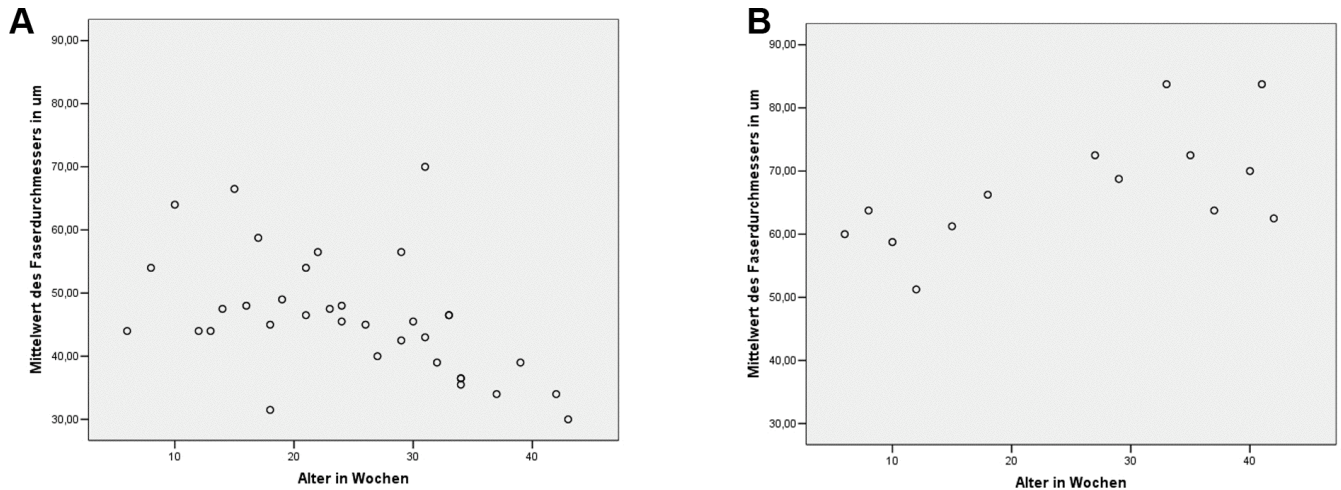
Die Untersuchung der Unterschiede der Gruppen in den maximalen Faserdurchmessern auf Signifikanz wurde auf dieselbe Art wie in den vorangegangenen Untersuchungen durchgeführt.

Beim Vergleich junger und alter SJL/J-Mäuse ergab der Levene-Test eine Signifikanz von  $p=0.669$ , weshalb im T-Test die Signifikanz für Varianzgleichheit von  $p=0.935$  gewertet wurde. Der Levene-Test ergab beim Vergleich junger SJL/J-Mäuse mit gleichaltrigen Kontrollen einen Wert von  $p=0.430$ , im T-Test wurde daher die Signifikanz für Varianzgleichheit von  $p=0.029$  beachtet. Bei der Betrachtung alter Mäuse beider Gruppen betrug die Signifikanz im Levene-Test  $p=0.750$ . Die Signifikanz für Varianzgleichheit im T-Test lag bei  $p=0.001$ . Die Untersuchung der Unterschiede zwischen jungen und alten Kontrollmäusen ergab im Levene-Test eine Signifikanz von  $p=0.406$ , im T-Test lag die Signifikanz der Varianzgleichheit bei  $p=0.020$ .

Daraus folgt, dass der Vergleich junger Mäuse beider Gruppen ein signifikantes Ergebnis genauso wie der Vergleich junger und alter C57BL/6-Mäuse lieferte. Der Vergleich alter Mäuse beider Stämme ergab eine hohe Signifikanz. Zwischen jungen und alten SJL/J-Mäusen herrschte kein signifikanter Unterschied.

### 8.3.2.6.3 Mittelwert

Bei der Betrachtung der Mittelwerte der Faserdurchmesser deutete sich bei den SJL/J-Mäusen eine abnehmende Tendenz an. Trotzdem zeigten sich einige Ausreißer. Bei den Kontrollmäusen zeigte sich keine deutliche Tendenz. Insgesamt schienen die Mittelwerte hier im Gegensatz zu den SJL/J-Mäusen zuzunehmen.

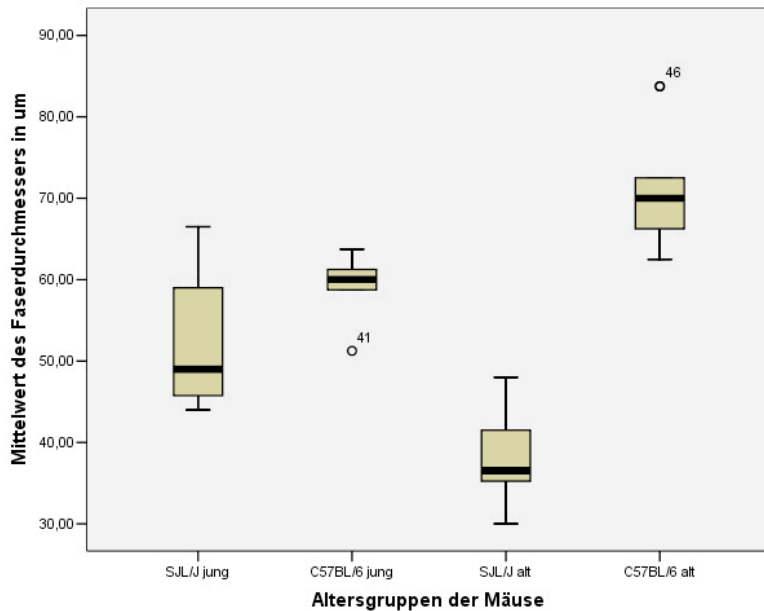


**Abb. 19: Auftragung der Mittelwerte der Faserdurchmesser über der Zeit (Alter). (A) SJL/J-Mäuse. (B) C57BL/6-Mäuse.**

Für die jungen SJL/J-Mäuse ergab sich ein Mittelwert für die Mittelwerte der Faserdurchmesser von  $52.0000\mu\text{m}$  (95% Konfidenzintervall  $42.9818\text{-}61.0182\mu\text{m}$ ) mit einer Standardabweichung  $SD=9.75107\mu\text{m}$ . Bei den alten SJL/J-Mäusen betrug der Mittelwert hier  $41.0000\mu\text{m}$  (95% Konfidenzintervall  $30.4440\text{-}51.5560\mu\text{m}$ ) mit einer Standardabweichung von  $SD=12.62650\mu\text{m}$ . In der jungen Kontrollgruppe lag der Mittelwert bei  $60.2083\mu\text{m}$  (95% Konfidenzintervall  $54.8050\text{-}65.6117\mu\text{m}$ ). Hier betrug die Standardabweichung  $SD=5.14883\mu\text{m}$ . Bei ihren älteren Stammesgenossen war der Mittelwert bei  $72.1875\mu\text{m}$  (95% Konfidenzintervall  $65.4902\text{-}78.8848\mu\text{m}$ ) angesiedelt, die Standardabweichung betrug  $SD=8.01087\mu\text{m}$ .

Somit war der Mittelwert am kleinsten in der Gruppe der alten SJL/J-Mäuse.

Im Boxplot stellten sich die Ergebnisse wie folgt dar.



**Abb. 20: Verteilung der Mittelwerte der Faserdurchmesser in den einzelnen Altersgruppen.**

Bei der Untersuchung auf signifikante Unterschiede im Mittelwert der Faserdurchmesser wurde wie bei den anderen Parametern verfahren.

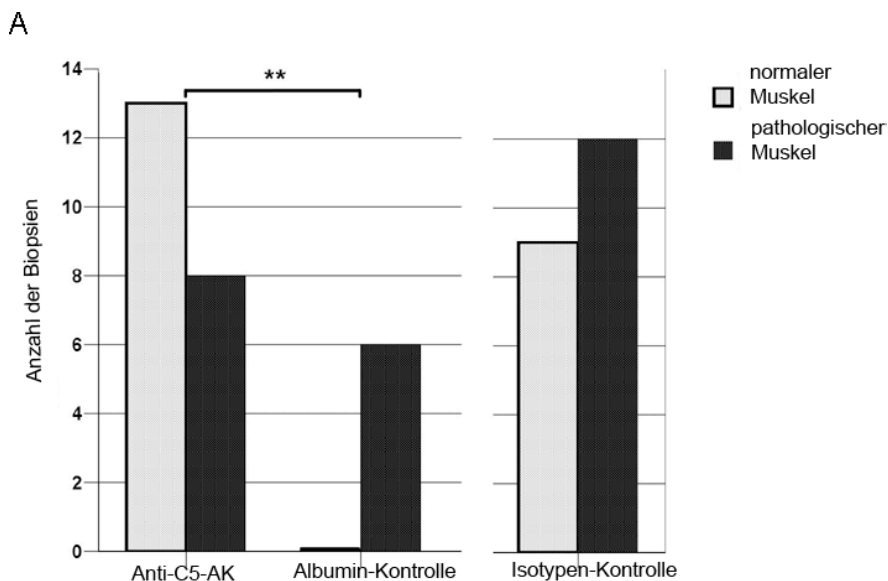
Beim Vergleich junger und alter SJL/J-Mäuse ergab der Levene-Test eine Signifikanz von  $p=0.895$ , daher wurde im T-Test der Wert für Varianzgleichheit mit  $p=0.085$  gewertet. Die Ergebnisse der jungen Mäuse, SJL/J- und Kontrollmäuse, zeigten bei einem Wert im Levene-Test von  $p=0.055$  im T-Test eine Signifikanz von  $p=0.092$  für die Gleichheit der Varianzen. Die Untersuchung der alten SJL/J-Mäuse und ihrer gleichaltrigen Kontrollen ergab im Levene-Test eine Signifikanz von  $p=0.456$ , im T-Test betrug die Signifikanz für die Varianzgleichheit  $p=0.000$ . Junge und alte C57BL/6-Mäuse ergaben eine Signifikanz für Gleichheit der Varianzen im T-Test von  $p=0.008$ , wobei die Signifikanz im Levene-Test  $p=0.325$  betrug.

Daher ist der Unterschied zwischen alten Tieren beider Stämme hoch signifikant, gleiches gilt für den Vergleich junger und alter C57BL/6-Mäuse. Weder der Vergleich junger und alter SJL/J-Mäuse noch der junger Tiere beider Stämme ergab signifikante Werte.

## 8.4 Anti-C5-Therapieversuch

Nach vier Wochen Therapie mit dem Anti-C5-Antikörper zeigte die Histologie signifikant weniger nekrotische Fasern bei den therapierten SJL/J-Mäusen als bei den Kontrollmäusen, die mit Albumin behandelt wurden, und den unbehandelten Tieren.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Chi-Quadrat-Tests. Der Unterschied zwischen Anti-C5-Antikörper-Therapie und Albumintherapie war hoch signifikant ( $p < 0.0005$ ). Der Vergleich von Tieren, die mit Anti-C5-AK behandelt wurden, und denen, die die Isotypen-Kontrolle IgG1 erhalten hatten, zeigte eine Tendenz zu Gunsten der Anti-C5-Therapie, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte.



B

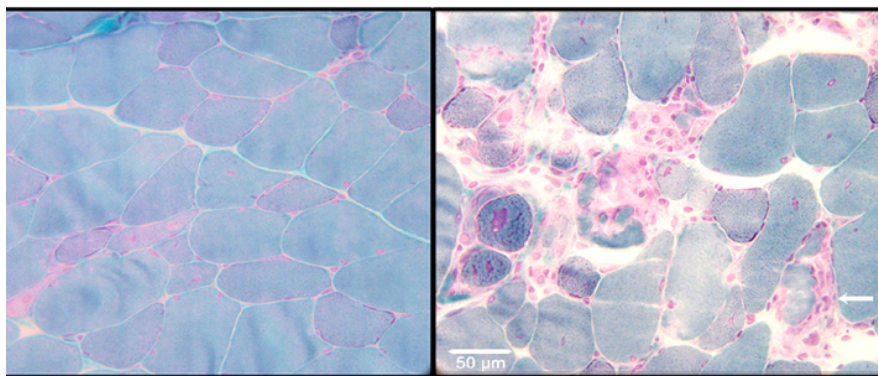


Abb. 21: (A) Muskelproben wurden von den SJL/J-Mäusen gewonnen, nachdem sie mit Anti-C5-AK (links), Isotypenkontrolle (rechts) oder Albumin (Mitte) behandelt worden waren. Bei

**<1% nekrotische Fasern wurde der Muskel als normal bis mild abnormal (grau) eingestuft. Lagen  $\geq 1\%$  nekrotische Fasern vor, wurde der Muskel als dystroph (schwarz) charakterisiert. (B) Links: Gomori Trichrome-Färbung des M. quadriceps femoris einer SJL/J-Maus nach 4 Wochen Anti-C5-AK-Therapie. Rechts: Gomori Trichrome-Färbung des M. quadriceps femoris einer SJL/J-Maus nach 4 Wochen Therapie mit der Isotypen-Kontrollen. Mit (\*\*) ist der hoch signifikante Unterschied zwischen Anti-C5-AK-Therapie und Albumin-Kontrolle gekennzeichnet.**

## 9 Diskussion

Die Gliedergürtelmuskeldystrophie 2B (LGMD 2B), auch Dysferlinopathie genannt, ist eine Muskeldystrophie des frühen Erwachsenenalters, die mit einer progressiven Muskelschwäche und einer starken Erhöhung der Serumkreatinkinase einhergeht. Für die Erforschung dieser Erkrankung ist ein gut charakterisiertes Mausmodell Voraussetzung. Die SJL/J-Maus stellt ein gut definiertes Modell dar, die Erkrankung wird hier durch eine Splice Site Mutation im Dysferlin-Gen bedingt. Diese Mutation wurde durch Wenzel et al. aus unserer Arbeitsgruppe bestätigt (37). Diese Arbeit hat als erste dieses Mausmodell klinisch wie histologisch über annähernd ihr gesamtes Lebensalter untersucht und liefert genaue Daten zu Krankheitsverlauf und histologischen Veränderungen. Aus diesen Daten ergaben sich die für interventionelle Studien interessanten Altersgruppen von 14 bis 20 Wochen Lebensalter vor der starken Krankheitsprogression sowie von 30 bis 34 Wochen, nachdem die Progression an Dynamik abnimmt.

### 9.1 Diskussion der Methoden

#### 9.1.1 Tierhaltung

Für die Charakterisierung eines Mausmodells wäre eine spezielle Laboreinrichtung zur Tierhaltung wünschenswert, wie sie in Deutschland nur in der German Mouse Clinic (GMC) in München existiert. Die Käfige der von uns untersuchten Tiere befanden sich in der Kleintierhaltung der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité Campus Virchow Klinikum, einer keimarmen Umgebung. Wir haben die SJL/J-Mäuse initial in Zehnergruppen in den Käfigen gehalten. Trotzdem ergaben sich diesbezüglich Probleme. SJL/J-Mäuse zeichnen sich durch auto- und auch fremdaggressives Verhalten aus. Diese Eigenschaft wurde erstmalig durch Crispens (38) deutlicher beschrieben und stellt immer wieder ein Problem bei Mausmodellen mit SJL/J-Mäusen dar. Dagegen fanden Miner et al. (39), dass nur die von den Jackson Laboratories bezogenen SJL/J-Mäuse extrem aggressiv waren, wohingegen die selbst gezüchteten SJL/J-Mäuse wenig bis gar keine Aggressivität zeigten. Ho et al. beschreiben (40), dass es typischerweise die männlichen Tiere sind, die durch häufiges Kämpfen untereinander oder Beißen von Weibchen bei Paarungen auffallen.

Dagegen zeichnen sich die in der gleichen Arbeit beschriebenen *Dysf*<sup>-/-</sup>-Mäuse und A/J-Mäuse durch eine geringe Intraspeziesaggressivität aus. Möglicherweise hat dieses Verhalten auch das Gedeihen und die Entwicklung der Mäuse behindert. Aus organisatorischen Gründen konnten wir die Mäuse jedoch nicht generell in Einzelkäfigen halten. In höherem Alter wurden sie zu fünf pro Käfig gehalten. Wir hatten aus o.g. Gründen nur weibliche Tiere. Trotzdem mussten wir feststellen, dass viele unserer Versuchstiere Bisswunden bis hin zu amputierten Schwänzen aufwiesen - selbst nach Einzelkäfighaltung.

### 9.1.2 Klinische Tests

Mit der Frage einer klinischen Einschätzung von Tiermodellen insbesondere Mausmodellen beschäftigt sich die wissenschaftliche Welt schon lange. In den 1960er Jahren herrschte eine erhitzte Diskussion innerhalb der psychopharmakologischen Gesellschaft. Schon 1964 vertrat Irwin den beobachtenden Ansatz, da er die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Medikamenteneffekte auf das Verhalten ermöglicht (41). Er veröffentlichte 1966 (42) und 1968 (43) seine Vorschläge für die Einschätzung von Verhalten und physiologischem Status der Maus. Primär ging es dabei um die Beurteilung von Medikamentenwirkungen auf die Versuchstiere, sein beobachtender Ansatz kann aber genauso zur Beschreibung von Krankheitsverläufen verwendet werden. Irwins Beurteilungsskala bezieht sich dabei auf das Verhaltensprofil, das neurologische und das autonome Profil der Maus. Dabei konnte der Grad der Wachsamkeit, der Lokomotion, des Affekts, des sozialen Verhaltens, der Ausdauer, der Haltung, der Koordination, des Muskeltonus und der Reflexe genauso beurteilt werden wie die autonomen Funktionen. Sein Ansatz ist ein rein beobachtender, weshalb es schon damals gewisse Kritikpunkte gab. Lister bemängelte 1964, dass die „Irwin-Prozeduren“ die Medikamenteneffekte nur an gesunden Tieren untersuchten, während sie dafür entwickelt worden waren, Präparate zu finden, die die Symptome abnormen Verhaltens bei Menschen vermindern könnten (44). Störungen der menschlichen Interaktion wie z.B. Aggression könnten mit diesen Tests nicht untersucht werden (45). Diverse Autoren wie z.B. Warburton und Brown (46), Heise et al. (47) und Cole et al. (48) kritisierten, dass Bewertungsskalen keine Medikamente, die potentiell kognitiv steigernd wirken, beurteilen können, wohingegen operant konditionierende Prozeduren auch diese Wirkungen untersuchen. Wie Warburton (45) in seinem



Kommentar zu Irwins Artikel schreibt, sind die größten Probleme beobachtender Ansätze die Konsistenz und Reproduzierbarkeit, die häufig stark untersucherabhängig sind. Trotzdem haben sich die „Irwin-Prozeduren“ bis zum heutigen Tag als erfolgreich erwiesen, um Medikamente einzuschätzen, die klinisch potentiell als analgetisch, muskelrelaxierend oder psychotherapeutisch anwendbar sind. Die gleiche Diskussion ist zur Jahrtausendwende in den Neurowissenschaften geführt worden. Während Gerlai und Clayton (49) einen naturalistischen Ansatz befürworten, der ethologische Methoden verwendet, plädieren Sarter und Berntson (50) für eine Vorgehensweise, in der eine rigorose Kontrolle und systematische Manipulation von Variablen stattfinden, die für die Verhaltensforschung essentiell sind. Gerlai und Clayton schreiben, dass Verhaltensanalyse deshalb schwierig sei, da man vermeintlich leicht durchzuführende Experimente auf der einen Seite und auf der anderen Seite schnell zu sammelnde quantitative Daten hat, man aber verschiedene Schwierigkeiten hat, die Effekte einer Mutation auf das Verhalten zu analysieren. Dies kann daran liegen, dass grundlegende Leistungsfaktoren das beobachtete Verhalten beeinflussen können. Daher fordern sie ethologisch relevante Aufgaben für die Versuche (51). Bei dieser Forderung berufen sie sich auf Lynn Nadel, die 1995 behauptete, dass sämtliche Studien „natur-blind“ seien, das heißt, dass kein erkennbarer Zusammenhang zwischen dem natürlichen, zum Überleben notwendigen Verhalten und den in den Versuchen geforderten Verhaltensweisen besteht (52). Gerlai und Clayton (49) betonen, dass Tiere im Labor Verhaltensweisen zeigen, die schwer zu interpretieren sind, da sie genetisch prädisponiert sind, selektiv auf bestimmte Reize zu reagieren, die unter Versuchsbedingungen verändert sind. Sarter und Berntson (50) antworten darauf, dass der naturalistische Ansatz zwar nützlich sei, um interessante Phänomene zu identifizieren, aber häufig die rigorose Kontrolle und die systematische Manipulation der für die Forschung wichtigen Variablen ausschließt. In ihrer Antwort schreiben Gerlai und Clayton (51), dass naturalistische Untersuchungen zwar besonders wichtig seien, um genetische Varianzen darzustellen, sie aber nicht ausschließlich anzuwenden seien. Vielmehr sehen sie die vielversprechendste Variante in der Kombination von ethologischer Relevanz und rigoroser Kontrolle. 1997 haben Rogers et al. (33) ein komplexes Protokoll zur Untersuchung von Mausphänotypen vorgestellt. Das SHIRPA besteht aus drei Phasen. In der ersten Phase, die auf den Beob-

achtungsprozeduren nach Irwin basiert, werden standardisierte Methoden verwendet, um ein Verhaltens- und Funktionsprofil durch Beobachtung zu erhalten. In dieser Phase werden Defizite in Gang und Haltung, bei motorischer Kontrolle und Koordination, Veränderungen in Erregbarkeit und Aggression, Salivation, Lakrimation, Piloerektion, Defäkation, Muskeltonus und Temperatur erfasst. Eine grobe Einschätzung der Analgesie ist ebenfalls möglich. Die zweite Phase beinhaltet eine komplexe Testbatterie zur Verhaltensanalyse, Balance und Koordination sowie pathologische Untersuchungen. Die Tests der dritten Phase sind maßgeschneidert für die Untersuchung existenter oder potentieller Krankheitsmodelle ebenso wie die Einschätzung phänotypischer Variabilität, die das Ergebnis unbekannter genetischer Einflüsse sein könnten. Im gleichen Jahr haben auch Crawley und Paylor ihre Vorschläge für ein komplexes Testprotokoll zur Phänotypisierung von Mäusen vorgestellt (53). Sie legen Wert auf eine allgemeine Gesundheitsuntersuchung zu Beginn, da diverse Gesundheitseinschränkungen mit den Anforderungen in den Tests kollidieren könnten und somit die Auswertung verfälschen würden. Dabei werden zunächst das Körpergewicht und die rektale Körpertemperatur bestimmt. Zusätzlich werden Beobachtungen über abnorme Körpereigenschaften in dieser Phase notiert. Dazu gehören schlecht gepflegtes Fell, kahle Stellen oder das Fehlen von Schnurrhaaren (54,55). Als Nächstes wird ein kursorischer neurologischer Status erhoben, der auf den Irwin-Prozeduren basiert. Anschließend werden verschiedene Verhaltens-, motorische Funktions- sowie Reflextests durchgeführt. Mit dem Rotarod und dem Hinterpfotenabdrucktest, bei dem das Laufmuster durch Pfotenabdrücke auf einem Papier entlang eines dunklen Tunnels untersucht wird, sollen Koordination, Gleichgewicht und Ataxie getestet werden. Im Anschluss sollen komplexe Tests, die das Lernverhalten und Gedächtnisprozesse evaluieren, z.B. Morris-Wasserlabyrinth, passives Vermeidungsverhalten, reiz- oder kontext-konditionierte Angst, durchgeführt werden. Crawley und Paylor (53) meinen, dass für jede Funktion mehrere, standardisierte und gut charakterisierte Verhaltensparadigmen verwendet werden sollten. Auch Lisa Gold hat sich 1999 mit dem Problem einer hierarchischen Strategie zur phänotypischen Analyse von Mäusen beschäftigt (56). Hierarchische Strategien können demnach angewendet werden, um Multi-levelanalysen des Verhaltens von Mäusen durchzuführen. Sie selbst hatte schon 1996 dargestellt, dass eine aussagekräftige Methode, um Verhalten zu verändern bzw. Unter-

schiede zwischen verschiedenen Gruppen zu verstärken, die Anwendung pharmakologischer Substanzen sei (57). Sie schreibt, dass die standardisierten neuroethologischen Protokolle kurze Prüfungsverfahren beinhalten, die an allgemeine neurologische Untersuchungen an Patienten erinnern. Auch sie stellt die Phase der Beobachtung an erste Stelle, um eine grobe Einschätzung von Verbesserung oder Verlust einer Fähigkeit zu ermöglichen. Die in den folgenden Tests untersuchten Entitäten sind Erregbarkeit, Nahrungsaufnahme, motorische Aktivität, kognitive Funktionen sowie Sinneswahrnehmungen. Die Verwendung hierarchischer Strategien, die aus verschiedenen Untersuchungen bestehen, maximiert die von jedem phänotypisierten Tier gewonnenen Informationen und ermöglicht die testübergreifende Interpretation der Ergebnisse. Dabei können komplexe Merkmale, die mit normaler oder abweichender neurologischer Funktion und Verhalten zusammenhängen, wie z.B. Kognition, zirkadianer Rhythmus, Appetit, hedonistische Kapazität, motorische Fähigkeiten und Schmerzempfindlichkeit, untersucht werden. Rogers et al. haben das SHIRPA bei der Untersuchung von sechs Mausstämmen angewendet und damit die Unterschiede zwischen den Stämmen dargestellt (58). Dabei ist das Problem des multiplen Testens durch das Untersuchen von jeweils einem Merkmal pro Test aufgetreten, das für umfangreiche Datenstrukturen bekannt ist. Dabei steigt das Risiko, falsche Veränderungen zu beobachten bzw. relevante Unterschiede nicht zu erkennen. Nur ein Jahr später haben Rafael et al. *Dmd<sup>mdx</sup>*- und *Dmd<sup>mdx3cv</sup>*-Mäuse mit dem SHIRPA untersucht (59). Obwohl allgemein die Meinung herrscht, dass diese Stämme kaum klinische Zeichen ihrer Muskeldystrophie zeigen, konnten im SHIRPA Defizite in vier spezifischen Tests nachgewiesen werden. Daher vertreten die Autoren die Meinung, dass besonders die erste Phase des SHIRPA nicht nur zur Identifizierung diskreter neuromuskulärer Mutanten, sondern auch zur Erkennung qualitativer Unterschiede zwischen Mutanten mit neuromuskulären Abnormalitäten dient. In ihrem genomweiten, phänotypisch orientierten Mutageneseprogramm verwendeten Nolan et al. 2000 (60) das SHIRPA, um die erhaltenen Phänotypen zu untersuchen, und erhielten so auf relativ einfache und schnelle Weise ausführliche Daten über sämtliche mutierten Stämme. Van der Staay und Steckler behaupten (61), dass die Beobachtung des Verhaltens und der Physiologie der Maus der erste Schritt in der Phänotypisierung des Verhaltens sei. Für sie stellen die Prozeduren, die auf den ursprünglichen Irwin-Prozeduren basieren, wie das SHIRPA oder die Vorschläge von Gold (56)

sowie Crawley und Paylor (53), Beispiele für die hierarchische Einschätzung des Verhaltensphänotyps mutierter Mausstämmen dar. Rogers et al. führten (62) eine longitudinale Studie neuronaler Defizite mittels des SHIRPA durch. Sie sprechen in ihrem Artikel die Notwendigkeit eines standardisierten Protokolls für solche Studien besonders in Bezug auf Medikamentenwirkungen an. In ihrer Studie beobachteten sie eine Dynamik der Defizite in Abhängigkeit vom Lebensalter der untersuchten Mäuse. Damit haben sie erstmalig die Wertigkeit des SHIRPA als effektives Protokoll zur Dokumentation eines progressiven neurologischen Defizits bewiesen. Gerlai beschreibt das SHIRPA als standardisierte und weit etablierte Testbatterie zur Verhaltensforschung (63). Den Vorteil dieser Herangehensweise sieht er in der Standardisierung und damit der Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Laboratorien.

Auf der Basis dieser Entwicklungen haben wir das SHIRPA als Grundlage für unsere Phänotypevaluation ausgewählt. Da die Tests konträr zu den Aussagen von Rogers et al. (33) doch relativ zeit- und materialaufwendig sind und wir die SJL/J-Mäuse nicht in ihrem kompletten Phänotyp charakterisieren wollten, haben wir unsere Tests zwar an das Protokoll angelehnt, uns aber für einfachere und spezieller auf die motorische Funktionsbeurteilung abzielende Versuche entschieden. Die klinische Einschätzung erwies sich als schwierig. Das lag zum einen an der fehlenden Korrelation zwischen Krankheits-schwere, wie in der Histologie nachgewiesen, und den motorischen Eigenschaften der Tiere und zum anderen an einer mangelnden Kooperation der Tiere bei bestimmten Testverfahren.

Besonders Crawley und Paylor (53) betonen die Fellqualität als generellen Marker für den Gesundheitszustand der Mäuse. Pachner und Kantor zeigten (64), dass Mäuse mit experimenteller autoimmuner Myasthenia gravis (EAMG) bei starker Krankheitsschwere ein struppiges Fell aufwiesen. Da hierbei die Beschaffenheit des Felles bezüglich seiner Glätte und seines Glanzes beurteilt wurde, unterliegt dieser Parameter einer gewissen Subjektivität, das heißt, er ist untersucherabhängig. Daher sollte bei Anwendung eine Kontinuität der Beobachter gewahrt werden, worauf wir in diesem Projekt geachtet haben. Außerdem mag diese Eigenschaft abhängig von der Untersuchungszeit sein, da der zirkadiane Rhythmus einen Einfluss auf den Zeitpunkt der Fellpflege und deren Intensität haben könnte.

Bei Irwin (43) sind Fortbewegung sowie Ausdauer, Körperhaltung, Koordination und Muskeltonus Bestandteil des neurologisch-ethologischen Profils. In dem von Rogers et al. (33) vorgestellten SHIRPA ist die Einschätzung von Gang und Haltung, motorischer Kontrolle, Koordination und Muskeltonus in der Beobachtungsphase wesentlich. In der zweiten Phase wird die Spontanmotorik in horizontaler und vertikaler Ebene gemessen. Crawley und Paylor (53) haben für die Beurteilung der Spontanmotorik Mäuse in einem leeren Käfig über einen Zeitraum von drei Minuten beobachtet, wobei auf ungewöhnliche Verhaltensweisen geachtet wurde. Lisa Gold (56) betrachtet die Einschätzung der Spontanmotorik als Grundlage für die Bewertung von Mäusen in der Mutagenese oder auch der pharmakologischen Forschung. Für die Untersuchung der Spontanmotorik haben Rogers et al. (58) eine Apparatur mit acht Perspex-Käfigen verwendet, die alle in einem Netz von Infrarotlasern standen, wobei die Anzahl der Laserstrahlunterbrechungen als Korrelat für die Spontanmotorik bestimmt wurde. Auch Nolan et al. (60) verwendeten zur Einschätzung der Spontanmotorik ein Lasersystem, wobei sie die Strahlunterbrechungen und die Anzahl der Käfigdurchkreuzungen in einem 35-Minuten-Intervall bewerteten. Wir haben uns aus Praktikabilitätsgründen für eine Vorgehensweise entschieden, die sich an Crawley und Paylor (53) orientiert. Bei den Ergebnissen handelt es sich um einen subjektiven Eindruck, den die Maus auf den Beobachter macht. Daher ist dieser Parameter vom Beobachter abhängig. Diesen Fehler haben wir durch Kontinuität minimiert. Zusätzlich ist dieser Eindruck relativ, da er von der Leistung der vorher gesehenen Mäuse abhängig ist. Da nicht alle Mäuse an einem Tag beurteilt wurden, ist hier eine potentielle Fehlerquelle vorhanden.

Ebenfalls aus Praktikabilitätsgründen haben wir nicht das Rotarod verwendet, wie es Jones und Roberts (65) beschrieben haben und welches Rogers et al. im SHIRPA (33) verwenden, sondern den Tieren ein einfaches Laufrad im Untersuchungskäfig angeboten. Wir konnten diesen Parameter nicht in die Auswertung nehmen, da die meisten Mäuse das Laufrad nicht benutzten, und ob alt oder jung, gesund oder krank sich meist nur von außen anlehnten, darunter durchkrochen oder durchkrabbelten. Wir vermuten, dass für diesen Test eine Gewöhnung an das Laufrad vor dem Untersuchungstag notwendig gewesen wäre, damit die Tiere das Gerät kennen und nutzen würden.

Im SHIRPA ist das „Drahtmaneuver“ als Teil der motorischen Testbatterie gelistet (33). Rafael et al. (59) beschreiben diesen Test als besonders sensitiven Test, um motorisch einge-

schränkte Mäuse, die sonst keine offenkundigen Zeichen der Muskelschwäche zeigen, zu identifizieren. Pachner und Kantor (64) haben bei Mäusen mit EAMG und ihren Kontrollen eine Abwandlung verwendet, wobei die Mäuse für 30s über ein Gitter gezogen wurden, an dem sie sich festhalten sollten. Nach dieser Übung wurde das Gitter mit der Maus invertiert, was das Tier dazu zwang, sich am Gitter festzuhalten. Im Gegensatz zu ihren Kontrollen fielen die myasthenischen Mäuse vom Gitter. Der Stäbchentest, bei dem der einzige Unterschied zum „Drahtmaneuver“ darin lag, dass ein Holzstäbchen und kein Draht verwendet wurde, sollte eine objektive, quantitative Einschätzung der motorischen Leistungsfähigkeit der zu untersuchenden Mäuse ermöglichen. Die Durchführung erwies sich jedoch besonders bei den Kontrollen als schwierig. Diese ließen sich häufig sofort fallen oder hielten sich erst gar nicht am Stäbchen fest. Daraus ergibt sich in der Auswertung, dass die alten SJL/J-Mäuse sich länger am Stäbchen hielten als ihre jungen Artgenossen oder die Kontrollmäuse. Somit ist der Stäbchentest nicht geeignet, um das Stadium der Krankheit zu erkennen bzw. kranke von gesunden Tieren zu unterscheiden. Bei dem von Crawley und Paylor (53) vorgestellten Protokoll ist das Gewicht einer der grundlegenden und daher zuerst zu bestimmenden Parametern. Es kann Aufschluss geben über das Ausmaß des binde- und fettgewebigen Umbaus der Muskulatur. Zudem mag es Hinweise auf Entwicklungsverzögerungen liefern. Aufgrund der auto- und fremdaggressiven Verhaltensweise kann die Entwicklung der Einzeltiere gehemmt oder verzögert verlaufen sein, da die schwachen Individuen in einem Käfig einen eingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser hatten, entzündete Wunden aufwiesen und optisch kleiner als ihre stärkeren Stammesgenossen wirkten. Auch die geistige und psychosoziale Entwicklung kann durch dieses Verhalten beeinträchtigt worden sein. Das könnte sich auf unsere Untersuchungen dahingehend ausgewirkt haben, dass die Mäuse nicht herausfanden, wie das Laufrad funktioniert.

## **9.2 Diskussion der Ergebnisse**

### 9.2.1 Klinische Tests

Für Crawley und Paylor (53) ist die Fellqualität bzw. die Fellpflege ein Marker für den allgemeinen Gesundheitszustand des Tieres. Howland et al. zeigten (66), dass ihre SOD1 G93A L26H transgenen Ratten, die ein Modell für die amyotrophe Lateralsklerose

darstellen, sich nach Beginn der Erkrankung durch nachlässige Fellpflege und damit struppigeres Fell auszeichnen. Auch unsere Untersuchung ergab, dass struppiges Fell bei den alten SJL/J-Mäusen fast durchgehend im Gegensatz zu den gesunden Kontrollen oder den jungen Stammesgenossen vorkam, die alle glattes Fell zeigten. Daraus folgt, dass die Fellqualität ein guter Parameter ist, um optisch abzuschätzen, ob es sich um eine kranke oder eine gesunde Maus handelt. Sie sagt jedoch nichts über die Schwere der Krankheit aus und erlaubt lediglich eine qualitative Einschätzung.

Bei mdx-Mäusen fanden Bulfield et al. (67) bei der Beschreibung dieses Dystrophiemodells, dass mdx-Mäuse insgesamt wenig Klinik bzw. motorische Einschränkungen aufwiesen. Lediglich bei einer zwölf Monate alten Maus fanden sich Muskelzittern und eine gestörte Koordination in der Spontanmotorik. Dagegen legen die Studien von Dangain und Vrbová (68) sowie Torres und Duchon (69) nahe, dass auch mdx-Mäuse Anzeichen einer leichten Form der Muskelschwäche zeigen. In der Untersuchung von Dangain und Vrbová zeigten zwei bis vier Wochen alte mdx-Mäuse eine gestörte Beweglichkeit bei visueller Inspektion. Torres und Duchon stellten dagegen fest, dass sich mdx-Mäuse weniger fest am Gitter festhielten als die Kontrollen. Muntoni et al. (70) fanden in einer quantitativen Analyse, dass junge mdx-Mäuse eine gestörte Spontanmotorik aufwiesen. In der Nachfolgestudie (71) versuchten sie, eine Korrelation zwischen dem Prozess der Nekroseinduktion und Regeneration und der in-vivo-Funktionsstörung nachzuweisen. Dabei ergaben die Untersuchungen, dass nur die jungen mdx-Mäuse von 15d Lebensalter eine signifikant reduzierte Spontanmotorik aufwiesen, ältere zeigten keinen Unterschied zu den Kontrollen. Lefaucheur et al. (72) untersuchten den Phänotyp der mdx-Maus im Alter. Sie stellten fest, dass bis zum Alter von 18 Monaten keine Muskelschwäche zu beobachten war. Vaillend et al. (73) untersuchten den Einfluss der Dystrophinmutation in elf Wochen alten mdx-Mäusen auf das Verhalten. Unter anderem untersuchten sie die Spontanmotorik in einem Zweikäftsystem sowie den Traktionsreflex („Drahtmaneuver“). Sie konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen mdx- und Kontrollmäusen finden. Heimann et al. (74) untersuchten die Interferenz von Myotonie und Muskeldystrophie. Dazu verwendeten sie mdx-Mäuse, A2G-adr-Mäuse und C57BL/6-Kontrollen. Auch sie überwachten die Spontanmotorik. Hier zeigte sich, dass mdx-Mäuse eine signifikant geringere motorische Aktivität aufwiesen als die C57BL/6-Kontrollen. Coccorello et al. (75)

zeigten in ihrer Untersuchung des Einflusses der mdx-Mutation auf die Wirkung von Nikotin, dass mdx-Mäuse eine signifikant geringere Spontanmotorik aufwiesen. Obwohl die differenzierteren Arbeiten eine reduzierte Spontanmotorik bei den mdx-Mäusen finden, ist nicht sicher, dass es sich hierbei um einen guten klinischen Parameter zur Untersuchung der Krankheitsschwere bei diesen Tieren handelt. Daher schlagen manche Autoren andere Untersuchungen als Verlaufsparemeter vor. So untersuchten z.B. Han et al. (76) mdx-Mäuse mittels Elektromyographie und konnten dort deutliche dystrophie-typische Potentiale erkennen.

Ein Mausmodell für die amyotrophe Lateralsklerose haben Ripps et al. (77) mit ihren SOD1-mutierten Mäusen vorgestellt. Diese Tiere zeigten ab dem dritten bis vierten Lebensmonat in der Spontanmotorik eine generalisierte Muskelschwäche, die innerhalb von 72h bis zur vollständigen Immobilisierung voranschritt. Auch Johnston et al. (78) verwendeten die Spontanmotorik, um ihre SOD G93A transgenen Mäuse zu untersuchen. Dabei stellten sie fest, dass diese Tiere eine normale motorische Funktion in den ersten drei bis vier Monaten aufwiesen. Sie zeigten eine Immobilisierung in mindestens einer Extremität im Alter von vier bis fünf Monaten. In ihrer Untersuchung von SOD1 transgenen Ratten haben Howland et al. (66) die Störung der Spontanmotorik als Marker für den Beginn der Motorneuronenerkrankung gewertet. Der Krankheitsbeginn stellte sich meist als abnormaler Gang der Hinterläufe nach durchschnittlich 115 Lebenstagen dar.

In dieser Studie zeigte sich für die Spontanmotorik eine Variablenkonstanz bei den alten SJL/J-Mäusen und den Kontrollmäusen. Bei den zuerst genannten war die Spontanmotorik immer herabgesetzt, bei den Kontrollmäusen stets normal. Bei den jungen SJL/J-Mäusen waren normale und herabgesetzte Spontanmotorik zu fast gleichen Teilen vertreten. Daraus folgt, dass die Spontanmotorik im späteren Verlauf ein sicheres Merkmal ist, um kranke Mäuse zu identifizieren. Die Veränderung dieses Merkmals verhält sich jedoch nicht linear zum Alter, es schlägt vielmehr abrupt um. Die Stärke der motorischen Beeinträchtigung gibt keinen Hinweis auf die Schwere oder Aktivität der Erkrankung. Man kann mit der Beobachtung der Spontanmotorik lediglich die älteren kranken Mäuse erkennen, weshalb weitere Untersuchungen notwendig sind, um genauere Aussagen über die Krankheitsschwere treffen zu können.



Die Ergebnisse aus dem Laufrad-Test erlauben keine Aussagen zu Erkrankung, Stadium und Schwere. Es scheint, dass ein gewisses Alter und eine gewisse Entwicklung sowie eine Gewöhnungsphase vonnöten sind, damit die Mäuse das Laufrad benutzen können. Daher ist diese Untersuchung nicht dafür geeignet, in diesem Mausmodell die Klinik zu beurteilen.

Für das 1968 von Jones und Roberts (65) eingeführte Rotarod gibt es härtere Daten. So zeigten Muntoni et al. (71) für mdx-Mäuse, dass junge Tiere (15d) eine extreme Schwäche und eine fünfmal reduzierte Ausdauer als die Kontrollen aufwiesen. Die 20 Tage alten mdx-Mäuse hatten ebenfalls eine signifikant schlechtere Ausdauer, ältere Tiere wiesen immer noch schlechtere Werte auf als die Kontrollen, zeigten aber keine signifikanten Unterschiede.

Im Stäbchentest waren die alten SJL/J-Mäuse soweit beurteilbar - besser als die Kontrollmäuse oder die jungen SJL/J-Mäuse. Daher ist dieser Test mit seinen Ergebnissen nicht zur Diagnostik von Muskelerkrankungen geeignet.

Auch bei mdx-Mäusen konnten bei der Untersuchung des Traktionsreflexes („Drahtmaneuver“) durch Vaillend et al. (73) keine Unterschiede zu den Kontrollmäusen festgestellt werden.

Weller et al. (30) verwendeten den Gittertest zur Einschätzung der Kraft der SJL/J-Mäuse. Hier zeigten die jungen SJL/J-Mäuse (drei bis fünf Monate alt) eine stärkere Kraft als die von Weller verwendeten Balb/c-Kontrollen. Bei Beginn der histopathologisch nachweisbaren Veränderungen ab dem sechsten Monat war jedoch ein signifikanter Kraftverlust nachweisbar, der bis zum neunten Lebensmonat fortschritt. Bei unseren Untersuchungen zeigte sich, dass alte SJL/J-Mäuse insgesamt schlechter abschnitten als die Kontrollen. Auch zeigten erstere tendenziell schlechtere Ergebnisse als junge Stammesgenossen. Trotzdem ist dieser Test nicht verlässlich, um sicher kranke von gesunden Tieren zu unterscheiden.

Es zeigte sich eine klare Altersabhängigkeit des Gewichtes, jedoch keine Abhängigkeit von der Erkrankung. Da das Gewicht bei jungen Tieren vergleichbar in beiden Stämmen war und erst im Alter eine merkliche, jedoch knapp nicht signifikante Differenz zeigte, wäre es möglich, dass mit einer größeren Stichprobe hier ein signifikantes Ergebnis erreicht worden wäre. Dann wäre das Gewicht zumindest im Alter ein Diskriminator zwischen gesund und

krank. So kann das Gewicht nicht als Parameter zur Bestimmung des Krankheitszustandes gewertet werden, es kann lediglich als Trend genutzt werden. Interessanterweise ist es bei mdx-Mäusen genau umgekehrt (79). Hier zeigten die kranken Tiere sowohl ein höheres Körpergewicht als auch schwerere Muskeln. Daraus folgern die Autoren, dass aufgrund des erhöhten Regenerationsprozesses im Rahmen der Duchenne-artigen Muskeldystrophie bei der mdx-Maus die Muskeln hypertrophieren und sich daraus ein höheres Körpergewicht als bei den Kontrollmäusen ergibt. Hingegen zeigten Howland et al. (66) für die SOD1 transgenen Ratten, dass diese nach Beginn der Erkrankung Gewichtsverlust als eines der klinischen Symptome aufwiesen.

Aus den o.g. Ausführungen folgt, dass keines unserer klinischen Testverfahren eine Diagnostik bezüglich der Muskeldystrophie bzw. ein Monitoren der Progression hinreichend verlässlich ermöglicht. Für diese Fragestellung müssen weitere, besser standardisierte Testverfahren entwickelt werden, um eine klinische Diagnose objektiv zu erlangen. Sind die technischen Voraussetzungen vorhanden, dann sind die Testvorschläge des SHIRPA (33) eine gute Alternative, um den Phänotyp und die Klinik dieser Mäuse zu beschreiben. Eine speziell auf die Eigenschaften der SJL/J-Maus zugeschnittene Testbatterie, die Fellqualität, Spontanmotorik, gegebenenfalls das Gewicht sowie sensitivere motorische Tests beinhaltet, wäre zur Einschätzung der klinischen Ausprägung der Erkrankung wünschenswert. Nichtsdestotrotz wird eine rein klinische Einschätzung unzureichend bleiben, weshalb zur Diagnostik der Muskelerkrankungen und der Beschreibung ihres Stadiums und ihrer Aktivität der Goldstandard der Histologie und Immunhistologie herangezogen werden muss.

### 9.2.2 Histologische Tests

Die histologischen Untersuchungen haben sich als bessere Parameter zum Monitoren der Krankheitsprogression in den SJL/J-Mäusen erwiesen als die klinischen Tests. Die klassischen Muskeldystrophiezeichen, Nekrose und Regeneration sowie binnenständige Nuklei, wurden noch um den Parameter „Entzündung“ bei der Dysferlin-Defizienz erweitert. Zusätzlich fanden wir in einigen Mäusen Amyloidablagerungen in den Herzschnitten.

Das Fasersplitting ist ein Ausdruck der überstürzten Faserregeneration, die im dystrophen Muskel neben dem Faseruntergang stattfindet. Schon Bittner et al. (31) zeigten, dass es

bei der SJL/J-Maus im höheren Alter (dort 450d) zu diesem Phänomen als Ausdruck der Muskelschädigung kommt. Bei Bansal et al. (20) hatten die SJL/J-Mäuse bis zum achten Lebensmonat ausgeprägte Muskelpathologien, u.a. Fasersplittings, entwickelt.

Auch unsere Ergebnisse zeigen, dass das Merkmal der Fasersplittings ein guter Parameter ist, um gesunden von krankem Muskel zu unterscheiden. Zudem lässt sich über die Anzahl der Fasersplittings pro 100 Fasern auch eine Aussage über das Stadium und die Schwere der Erkrankung treffen, da die Anzahl mit dem Alter steigt.

Muntoni et al. (71) fanden auch bei 20 Monate alten mdx-Mäusen Fasersplittings als histologisches Korrelat der Muskeldystrophie. Auch für die *Dysf<sup>f/-</sup>*-Maus fanden Ho et al. (40) ab dem fünften Monat Fasersplittings als Ausdruck der Muskelschädigung, bei der A/J-Maus war es in milderer Ausprägung zu beobachten.

Somit ist die Anzahl der Fasersplittings pro 100 Fasern ein unspezifischer, aber dennoch verlässlicher Parameter zur Einschätzung der Krankheitsschwere sowie zur Unterscheidung zwischen kranken und gesunden Tieren.

Da bei gesunden Muskelfasern die Kerne wandständig liegen und nur zur regenerativen Spaltung in das Innere des Zytoplasmas wandern, sind zentralisierte Kerne ein Ausdruck der Umbauvorgänge im dystrophen Muskel. In der Arbeit von Weller et al. (30) zeigte sich, dass die Zentralisierung von Nuklei eine der frühen histologischen Manifestationen der Muskeldystrophie bei den SJL/J-Mäusen darstellt. Bei ihnen zeigten schon die jungen Tiere, zwei und vier Monate alt, viele Fasern mit zentralisierten Kernen. Ab dem achten Lebensmonat wiesen die übriggebliebenen Muskelfasern häufig zentralisierte Nuklei auf. Auch bei Bittner et al. (31) trat dieses Merkmal schon bei sehr jungen (24d) SJL/J-Mäusen auf. Bansal et al. (20) beschreiben das Auftreten von zentralisierten Kernen als sporadisch ab einem Alter von zwei Monaten, wobei die Anzahl im weiteren Verlauf stieg. Bei den von uns untersuchten SJL/J-Mäusen waren zentralisierte Kerne selbst in den jüngsten Tieren nachweisbar, die Anzahl nahm mit dem Alter massiv zu.

Auch bei den mdx-Mäusen konnten Bulfield et al. (67) ab einem Alter von drei Wochen zentralisierte Kerne in einigen ansonsten normalen Muskelfasern nachweisen. Ab dem Alter von neun Lebenswochen waren zentralisierte Kerne die charakteristische Veränderung. Bei Anderson et al. (79) waren zentralisierte Kerne in der 32 Wochen alten mdx-Maus in fast allen Fasern nachweisbar. Übereinstimmend berichten Tanabe et al. (80),

Torres und Duchon (69), Carnwath et al. (81), Karpati et al. (82) sowie Woo et al. (83), dass zentralisierte Kerne in regenerierenden Fasern das Erkennungsmerkmal der mdx-Maus ist, wobei die Anzahl der zentralisierten Kerne mit dem Alter zunimmt, bis die Mehrheit der Fasern betroffen ist. Bei Muntoni et al. (71) zeigten die mdx-Mäuse ab dem 20. Lebenstag in kleinen Faszikeln basophile regenerierende Fasern mit zentralisierten Kernen. Ab dem 30. Lebenstag war die Mehrheit der Fasern von dieser Pathologie betroffen. Im sechsten Lebensmonat zeigten >90% der Fasern zentralisierte Kerne. Ho et al. (40) konnten für die *Dys<sup>f/-</sup>*-Mäuse zeigen, dass das erste histologische Zeichen der Muskeldystrophie zentralisierte Kerne ab einem Lebensalter von zwei Monaten war. Bei den von Ho ebenfalls untersuchten A/J-Mäusen kam es zu ähnlichen, wenngleich nicht so frühzeitig auftretenden und nicht so progressiv verlaufenden Pathologien.

Daraus folgt, dass das Vorhandensein zentralisierter Kerne ein unspezifischer, aber sensitiver Marker für die Diagnose der Erkrankung und zugleich auch zur Einschätzung der Krankheitsschwere ist.

Nekrotische Fasern sind ein Ausdruck des Faseruntergangs, in gesunden Mäusen dürften selbst im Alter nur wenige bzw. keine nekrotische Fasern in den histologischen Schnitten nachweisbar sein.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass das Merkmal der Anzahl der nekrotischen Fasern pro 100 Fasern eine gute Möglichkeit ist, histologisch gesunde und kranke Mäuse zu unterscheiden. Einzig einschränkend ist, dass die Anzahl pro Gewebeschnitt nicht sehr hoch ist und damit großen Schwankungen je nach gewähltem Ausschnitt bei der mikroskopischen Untersuchung unterliegen kann. Auch bei der Probenentnahme kann zufällig eine überdurchschnittlich hohe oder niedrige Anzahl an nekrotischen Fasern erfasst werden. So können große Unterschiede entstehen.

Auch bei mdx-Mäusen sind Faserdegeneration sowie Fasernekrosen ab der neunten Lebenswoche ein häufiges Merkmal der Dystrophie (67). Die von Dangain und Vrbová (68) untersuchten mdx-Mäuse zeigten eine abrupt auftretende und stark ausgeprägte Fasernekrose beginnend ab einem Alter von drei Wochen, der eine schnelle Regeneration bis zur vollständigen Restitution in der fünften Lebenswoche folgte. Damit übereinstimmend beobachteten Anderson et al. (79), dass Nekrosen in der 32 Wochen alten mdx-Maus weniger stark ausgeprägt waren als in der vier Wochen alten. Torres und Duchon (69)

fanden im gleichen Jahr deutliche Nekrosen kombiniert mit einer histiozytären Infiltration bei fünf Tage alten mdx-Mäusen. Das Ausmaß der Nekrose erreichte seinen Höhepunkt in der fünften bis sechsten Lebenswoche, sie war jedoch in geringerem Ausmaß durch das gesamte Leben nachweisbar. Die Regeneration begann im Alter von zehn Tagen und war in allen Altersstufen nachweisbar. Muntoni et al. (71) fanden bei mdx-Mäusen im Alter von 17d erste Nekrosen, am 20. Lebenstag waren sie deutlich ausgeprägter, betrafen häufig mehrere Fasern oder ganze Faszikel. Ab dem 30. Lebenstag war der nekrotische Prozess weniger aktiv, im Alter von sechs Monaten waren nur noch wenige nekrotische Fasern nachweisbar. Die *Dys<sup>f/-</sup>*-Mäuse von Ho et al. (40) zeigten ab dem fünften Lebensmonat durchweg nekrotische Fasern als Ausdruck der zunehmenden Muskeldystrophie. Auch die A/J-Mäuse zeigten diese Befunde, nur dass bei ihnen die Dystrophie sehr viel langsamer ablief.

Somit sind nekrotische Fasern ein guter Marker für die Diagnose der Erkrankung. Zudem zeigte sich eine Abhängigkeit vom Alter, was zudem eine Aussage über die Krankheits-schwere erlaubt.

Schon Weller et al. berichteten (30), dass inflammatorische Veränderungen in allen untersuchten sechs und acht Monate alten SJL/J-Mäusen nachzuweisen waren. Die Bewertung dieses Merkmals in der einfachen Histologie trug hier nicht dazu bei, die Schwere der Erkrankung oder das Stadium zu diagnostizieren. Auch Bansal et al. (20) fanden, dass bei allen Tieren im achten Lebensmonat entzündliche Infiltrate in Form von Makrophagen vorlagen. Nemoto et al. (84) untersuchten 20 Mäuse in vier verschiedenen Altersgruppen (60d, 120d, 240d und 360d) und konnten zumindest die Tendenz nachweisen, dass der Grad der Entzündungsreaktion in den älteren Tieren stärker war. In immunhistologischen Färbungen fanden sie, dass die Anzahl der Entzündungszellen mit fortschreitendem Alter anstieg, wobei die prozentuale Aufteilung der Subtypen konstant blieb. Somit scheinen immunhistologische Färbungen vonnöten zu sein, um die Entzündungsaktivität als Parameter der Erkrankungsschwere verwenden zu können. Dahingegen ist der Unterschied in diesem Merkmal in unserer Untersuchung zwischen jungen SJL/J- und jungen Kontrollmäusen hoch signifikant. Da auch im Vergleich der alten Mäuse beider Stämme ein hoch signifikanter Unterschied nachzuweisen ist, ist dieses Merkmal dafür geeignet, gesunde von kranken Mäusen zu unterscheiden. Bittner et al. (31) beschreiben ent-

zündliche Infiltrate in der SJL/J-Maus ab dem siebten Lebensmonat. Bulfield et al. (67) konnten bei den von ihnen untersuchten mdx-Mäusen entzündliche Infiltrate in Form phagozytischer Zellen ab der dritten Lebenswoche nachweisen, welche im Verlauf zunahm. Auch Anderson et al. (79) beschreiben bei vier Wochen alten mdx-Mäusen Flecken blasser und degenerierter extrafusaler Fasern sowie eine Infiltration mit mononuklearen Zellen. Diese Degeneration und Infiltration erwiesen sich in Längsschnitten als segmental und betrafen nur einen Teil der Faserlänge. Die entzündlichen Infiltrate waren bei der vier Wochen alten Maus stärker ausgeprägt als bei der 32 Wochen alten. Bei Muntoni et al. (71) waren ab dem 20. Lebenstag in den untersuchten mdx-Mäusen Infiltrate mit Phagozyten nachweisbar. Lefaucheur et al. (72) untersuchten alte mdx-Mäuse (mind. 20 Monate alt) und fanden auch dort entzündliche Infiltrate in vielen untersuchten Muskeln. Bei den Dysferlin-defizienten *Dysf*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnten Ho et al. (40) ab dem fünften Lebensmonat eine Infiltration durch mononukleare Zellen nachweisen, diese Veränderungen liefen bei den A/J-Mäusen langsamer ab.

Daher eignet sich die Beurteilung der Stärke und Anzahl der entzündlichen Infiltrate auf subjektiver Basis im direkten Vergleich zur Identifizierung der kranken Individuen in einem Kollektiv. Eine Aussage über die Schwere der Erkrankung oder ihre Aktivität sowie ihr Stadium lässt sich daraus nicht machen.

Bei der Gliedergürtelmuskeldystrophie kommt es zu einer Atrophie der Muskeln und nachfolgend zu einem Muskelerersatz durch Fett- und Bindegewebe. Weller et al. (30) beschrieben, dass dieser Prozess bei der SJL/J-Maus um den zehnten Lebensmonat begann und mit fortschreitendem Alter weiter zunahm. Bittner et al. (31) beobachteten hingegen den Muskelfaserersatz durch Fett- und Bindegewebe schon ab dem siebten Lebensmonat. Bansal et al. (20) zeigten damit übereinstimmend, dass bei SJL/J-Mäusen im achten Lebensmonat schon Fettgewebseinlagerungen nachweisbar waren.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Gewebszusammensetzung sich in kranken Mäusen zwar verändert, dieser Unterschied zwischen jungen und alten Tieren aber keine Signifikanz zeigt. Damit ist dieses Merkmal ungeeignet, um eine Aussage über das Krankheitsstadium oder die Aktivität treffen zu können. Auch der Unterschied zwischen den jungen Mäusen beider Gruppen ist nicht signifikant, weshalb bei jungen Tieren dieses Merkmal nicht zur Differenzierung zwischen kranken und gesunden Individuen dient. Im

höheren Alter und mit Fortschreiten der Erkrankung gewinnt dieses Merkmal an Bedeutung, bei den alten Tieren kann man mit seiner Hilfe zwischen krank und gesund unterscheiden.

Die mdx-Mäuse zeigten schon ab der zwölften Lebenswoche einzelne Foci von Fettzellenansammlungen (67). Cooper beschreibt die Abwesenheit von relevanten Fetteinlagerungen in der mdx-Maus als markanten Unterschied zur humanen Muskeldystrophie Duchenne (85). Bei *Dysf<sup>f/-</sup>*-Mäusen konnten Ho et al. (40) Fetteinlagerungen ab dem fünften Lebensmonat nachweisen, bei den A/J-Mäusen trat dieses Merkmal wie alle anderen in einer milderen Ausprägung und einem langsameren Verlauf auf.

Daher hilft dieses Merkmal erst im höheren Lebensalter der Versuchstiere, um zwischen kranken und gesunden Tieren zu differenzieren. Es erlaubt keine Aussage zu Aktivität und Schwere der Erkrankung und hilft bei der Diagnostik erst in den späteren Krankheitsstadien.

Ab dem achten Lebensmonat beschrieben Weller et al. (30) Kalibervarianzen in den Faserquerschnitten der SJL/J-Mäuse. Diese Varianzen nahmen mit fortschreitendem Alter und Krankheitsverlauf noch weiter zu. Damit stimmen sie mit den Befunden von Bittner et al. (31) überein, die eine große Faserkalibervarianz bei Mäusen mittleren Alters (hier 279d) bemerkten. Auch bei den mdx-Mäusen zeigte sich ab einem Alter von drei Wochen eine leichte Kalibervarianz, die ab einem Alter von neun Wochen durch Vergrößerung einzelner und Atrophie anderer Fasern deutlich prominent war (67). Anderson et al. (79) beschreiben bei der 32 Wochen alten mdx-Maus eine extreme Kalibervarianz als dominantes Merkmal. Muntoni et al. (71) fanden bei den 15d alten mdx-Mäusen bereits eine moderate Kalibervarianz, die im Alter zunahm, wobei im jungen Alter nur atrophe neben gesunden Fasern zu sehen waren, während im höheren Alter auch regenerierte hypertrophe Fasern auftraten. Bei 20 Monate alten mdx-Mäusen fand sich ebenfalls eine starke Variabilität der Faserdurchmesser bedingt durch atrophe, gespaltene und hypertrophierte Fasern. Ho et al. (40) fanden bei ihrer *Dysf<sup>f/-</sup>*-Maus ab dem fünften Monat eine deutliche Kalibervarianz, bei den A/J-Mäusen waren alle pathologischen Merkmale milder ausgeprägt. Um diese Beobachtung zu quantifizieren, maßen wir die Querschnitte der Fasern und bestimmten den kleinsten und den größten Durchmesser.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der o.g. Autoren fanden wir, dass die starken Veränderungen des Kaliberdurchschnitts erst im späteren Krankheitsverlauf auftreten, dann jedoch ein charakteristisches, wenngleich unspezifisches Zeichen der Erkrankung sind. Dabei treten hypertrophierte, große Fasern relativ früh auf, insgesamt dominieren jedoch die kleinen, atrophierten Fasern.

### 9.2.3 Amyloid und Dysferlin

In einigen SJL/J-Mäusen fand sich AA-Amyloid in den Herzmuskelschnitten. Diese mutmaßlich nicht immunglobulin assoziierte Amyloidform wurde 1971 erstmalig beschrieben (86,87,88,89) und wurde als AA-Amyloid bezeichnet, da es durch das Akute-Phase-Protein Serum-Amyloid A ausgelöst wird (90). Diese Form ist mit chronischen Entzündungsprozessen wie z.B. rheumatoider Arthritis (87,88,89,90,91), familiärem mediterranen Fieber (88,92), Malaria (93) und Morbus Waldenström (94) vergesellschaftet. Interessanterweise ist auch bei einigen Patienten mit LGMD 2B Amyloid im Skelettmuskel vorhanden. Dieses ist jedoch kein AA-Amyloid, sondern scheint vom Dysferlin selbst zu stammen (95). Die Koinzidenz lässt aber vermuten, dass die Dysferlin-Defizienz zu proamyloidogenen Bedingungen im Gewebe führt. In diesem Zusammenhang könnte auch interessant sein, dass Dysferlin außer am Skelettmuskel auch in Monozyten besonders exprimiert ist. Die Monozyten sind an der Degradation und dem Abtransport von Amyloid B beteiligt (96).

### 9.2.4 Anti-C5-Therapieversuch

Unsere Ergebnisse zeigen einen positiven therapeutischen Effekt durch die Gabe von Anti-C5-Antikörpern. Nach der Gabe der Isotypenkontrolle mit polyklonalem IgG<sub>1</sub> konnte ebenfalls ein positiver Effekt in der Histologie der Muskulatur gezeigt werden. Dieses Ergebnis werten wir als unspezifischen Effekt der Immunglobuline, wie er häufig z.B. von Basta et al. (97) nach der intravenösen Administration von Immunglobulinen im Rahmen anderer Erkrankungen beschrieben worden ist. Daraus folgt, dass die Gabe spezifischer Antikörper bei der Dysferlinopathie nach weiteren Interventionsstudien eine mögliche Therapieoption sein könnte.



### 9.3 Diskussion des Mausmodells

Wie durch Hohlfeld et al. (29) und Weller et al. (30) schon gezeigt, stellen die SJL/J-Mäuse ein gutes Mausmodell für die spontan auftretende inflammatorische Myopathie dar. Bittner et al. (31) konnten später (1999) nachweisen, dass eine Deletion im Dysferlin-Gen zu dieser Myopathie führt, was die SJL/J-Mäuse zum einzigen natürlichen Modell (neben der A/J-Maus) für die Dysferlinopathie beziehungsweise die Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2B (LGMD 2B) macht. Dennoch hat dieses Modell gewisse Nachteile. Laut Angaben des Züchters (98) neigen die Mäuse nach einem Lebensjahr zu Retikulumzellsarkomen, die den M. Hodgkin simulieren. Diese traten bei unseren Tieren früher auf mit zum Teil ausge dehnten Tumoren in Leber und Milz. Außerdem sind diese Tiere empfänglich, eine experimentelle autoimmune Enzephalopathie zu entwickeln, die in der Forschung zur Multiplen Sklerose ihre Verwendung findet. Beim Züchter findet sich der Hinweis ebenso wie bei Crispens (38) sowie Ho (40), dass sich die männlichen Tiere dieser Rasse durch extreme Aggressivität auszeichnen. Hingegen fanden Miner et al. (39) nur bei den von JAX erstandenen Tieren diese Aggressivität, bei den selbst gezüchteten war sie nicht oder kaum nachweisbar. Bei unseren Mäusen handelte es sich ausschließlich um weibliche Individuen, trotzdem zeigten auch diese ein erhöhtes Aggressionsniveau. Dies wurde durch viele Bisswunden deutlich. Manche Tiere wiesen ein gestörtes Sozialverhalten auf, waren unterernährt und schreckhaft. Die spätere Unterbringung in kleineren Gruppen verringerte das Problem zwar, konnte es jedoch nicht lösen.

Insgesamt muss man sagen, dass SJL/J-Mäuse kein ideales Modell für die Dysferlinopathie aufgrund der Nebenerkrankungen, ihres aggressiven Verhaltens sowie des Fehlens einer Kontrolle mit identischem genetischen Hintergrund sind. Es gibt andere Mausmodelle für die Dysferlinopathie. Hier ist die A/J-Maus zu nennen, auch von Jackson Laboratories, die ein ETn-Retrotransposon von 5-6kb in Intron 4 des Dysferlin-Gens eingefügt bekommen hat. Diese Mäuse sind bezüglich der Insertion homozygot. Die Muskelerkrankung schreitet langsamer fort als bei SJL/J-Mäusen, wofür Dysferlin unabhängige genetische Faktoren verantwortlich gemacht werden. Bei den A/J-Mäusen sind gleichfalls die proximalen Muskeln stärker betroffen als die distalen, sie zeigen jedoch auch eine Beteiligung der abdominellen Muskulatur (40). Auch dieses Mausmodell weist diverse andere Mutationen auf. A/J-Mäuse gelten als besonders wenig aggressiv (99). Ein weiteres

Mausmodell stellt die *Dysf*<sup>-/-</sup>-Maus (B6.129-*Dysf*<sup>tm1Kcam</sup>/Mmmh) dar, die in der Arbeitsgruppe von Kevin Campbell, University of Iowa, hergestellt wurde. Bei diesen Mäusen ist eine Deletion von 12kb, die die letzten drei Exons (Exons 53-55, aa1983-2080) des Dysferlin-Gens enthält, durchgeführt worden. Diese Deletion führt zum Verlust der transmembranen Region im Genprodukt. Die Mäuse haben einen gemischten 129vJ- und C57BL/6-Hintergrund. Sie sind homozygot für diese Deletion. Bei diesen Mäusen lassen sich einzelne nekrotische Muskelfasern bereits nach acht Lebenswochen nachweisen, die aktive Myopathie wird jedoch erst ab der 32. Lebenswoche apparent. Der Krankheitsverlauf ist bei diesen Mäusen vergleichbar mit dem der SJL/J-Mäuse und damit schneller progredient als in der A/J-Maus (20). Eine weitere *Dysf*<sup>-/-</sup>-Maus ist die von der Arbeitsgruppe von Robert Brown publizierte (40). Bei diesen *Dysf*<sup>-/-</sup>-(Brown)-Mäusen wurde eine 1.8kb große Region im Genom deletiert, die das Exon 45 (aa1628-1685) des Dysferlin-Gens beinhaltet. Durch diese Deletion wird ein Teil der fünften C2-Domäne (C2E) des Proteins entfernt. Auch diese Mäuse besitzen einen gemischten 129vJ- und C57BL/6-Hintergrund und sind homozygot bezüglich dieser Deletion. Bei diesen Mäusen lassen sich degenerierende Muskelfasern histologisch ab der achten Lebenswoche nachweisen, vornehmlich in den proximalen und abdominellen Muskeln. Ab der 24. Woche ist eine aktive Myopathie in allen Skelettmuskeln nachweisbar. Ab einem Alter von 32 Wochen zeigen einige der Mäuse eine Muskelschwäche in den Hinterläufen. Die Krankheit verläuft ähnlich schnell wie bei den SJL/J- und den *Dysf*<sup>-/-</sup>-(Campbell)- und damit schneller als bei den A/J-Mäusen. Ähnlich wie bei den SJL/J- und den A/J- ist bei den *Dysf*<sup>-/-</sup>-(Brown)-Mäusen die proximale Muskulatur schwerer betroffen als die distale. Auch sie zeigen eine Beteiligung der abdominellen Muskeln, ähnlich wie bei den A/J-Mäusen, und zeichnen sich durch ein niedrigeres Aggressivitätsniveau aus als die SJL/J-Mäuse (40). Als letztes gibt es die C57BL/10.SJL-*Dysf*-Maus aus der Arbeitsgruppe von Dr. R. Bittner, Medical University of Vienna (100). Die Mutation ist dieselbe wie in den SJL/J-Mäusen. Sie wurde auf den C57BL/10 Hintergrund durch wiederholte Retourkreuzungen übertragen. Diese Tiere sind >99.5% homozygot für die Dysferlin-Mutation. Histologische Muskelveränderungen und vereinzelte inflammatorische Infiltrate lassen sich ab der dritten Lebenswoche nachweisen. Die einzelnen Mäuse können verschiedene Verteilungsmuster der Muskelschwäche zeigen, es sind entweder die proximalen oder die distalen Muskeln schwerer betroffen.

Auch hier ist der Verlauf der Erkrankung ähnlich dem der SJL/J, *Dysf*<sup>-/-</sup>-(Campbell)- und *Dysf*<sup>-/-</sup>-(Brown)-Mäuse und somit schneller als bei den A/J-Mäusen. Ein ganz neues Mausmodell ist die BlaA/J-Maus von Isabelle Richard, Genethon, Frankreich, wobei die A/J-Mutation auf einen C57BL/6-Hintergrund übertragen wurde. Hier liegt also eine Dysferlin-defiziente Maus mit passender Kontrolle vor. Die Maus ist bislang nur auf einem Kongress vorgestellt worden und scheint einen sehr milden Phänotyp zu haben.

Bisher sind bei diesen Mausmodellen mit Ausnahme der A/J-Maus weniger Nebenerkrankungen beschrieben als bei der SJL/J-Maus, was der Vorteil dieser Modelle ist. Auch verfügen die meisten über eine geringer ausgeprägte Intraspeziesaggressivität. Das Problem der Kontrollen mit demselben genetischen Hintergrund konnte nur teilweise gelöst werden. Der große Nachteil all dieser neuen Modelle ist, dass eine systematische Charakterisierung der allgemeinen und im Speziellen der motorischen Funktionen sowie der histologischen Veränderungen nicht stattgefunden hat.

Es gäbe also gute Argumente, bei der Erfassung der Dysferlin-defizienten Muskeldystrophie andere Mausmodelle der SJL/J-Maus vorzuziehen. In der Realität stehen die Knockout-Mäuse anderen Forschern jedoch nicht zur Verfügung. Mit der SJL/J-Maus haben wir nun ein gut charakterisiertes Modell mit frühem Krankheitsbeginn und gut quantifizierbarer Progression zwischen der 18. und 28. Lebenswoche. Diese Daten sind unverzichtbar für Untersuchungen wie mit dem neuen Kontrastmittel Gadofluorine M im 7T-MRT. Hier wurde die Kontrastmittelanreicherung im Skelettmuskel von jungen (12-15 Wochen alt) und alten (>30 Wochen alt) SJL/J- und C57BL/6-Mäusen für Gadofluorine M und Gadomer untersucht. Es zeigte sich, dass das Enhancement mit Gadofluorine M im Skelettmuskel der alten SJL/J-Mäuse signifikant stärker war als bei den Kontrollmäusen. Dies galt sowohl für die Uptake-Geschwindigkeit als auch für die Menge des aufgenommenen Gadofluorine M. Für das ebenfalls untersuchte Gadomer ließ sich kein Unterschied im Enhancement zeigen. In histologischen Untersuchungen zeigte sich, dass Carbocyanin-markiertes Gadofluorine M in Skelettmuskelfasern der SJL/J-Mäuse nachweisbar war. Bei den Kontrollmäusen ließ sich kein Gadofluorine M im Muskel nachweisen (101). In seinem Kommentar zu diesem Artikel stellt Unger in Aussicht, dass dies potenziell die Möglichkeit in sich birgt, die Muskeldystrophie nicht-invasiv über ihren Verlauf mittels

MRT im Gegensatz zu der bisher einzig möglichen Überwachung per Muskelbiopsien zu  
monitoren (102).

## Literaturverzeichnis

- 1 Cardamone M, Darras BT, Ryan MM: Inherited Myopathies and Muscular Dystrophies. *Semin Neurol.* [2008](#), *28*(2), [250-9](#),
- 2 Bansal D, Campbell KP: Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol.* [2004](#), *14*(4), [206-13](#),
- 3 Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM: Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature.* [1986](#), *323*(6089), [646-50](#),
- 4 Hoffman EP, Brown RH jr, Kunkel LM: Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* [1987](#), *51*(6), [919-28](#),
- 5 Bushby KM, Beckmann JS: The limb-girdle muscular dystrophies--proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul Disord.* [1995](#), *5*(4), [337-43](#),
- 6 Bushby KM: Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain.* [1999](#), *122*, [1403-20](#),
- 7 Bashir R, Strachan T, Keers S, et al.: A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Hum Mol Genet.* [1994](#), *3*(3), [455-7](#),
- 8 Bejaoui K, Hirabayashi K, Hentati F, et al.: Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14. *Neurology.* [1995](#), *45*(4), [768-72](#),
- 9 Weiler T, Bashir R, Anderson LV, et al.: Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Hum Mol Genet.* [1999](#), *8*(5), [871-7](#),
- 10 Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Tanaka H, et al.: Clinical and molecular analysis of a large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy. *Brain.* [1996](#), *119*, [1895-909](#),
- 11 Liu J, Aoki M, Illa I, et al.: Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet.* [1998](#), *20*(1), [31-6](#),
- 12 Bashir R, Britton S, Strachan T, 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](#),
- 13 Anderson LV, Davison K, Moss JA, et al.: Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet.* [1999](#), *8*(5), [855-61](#),
- 14 Haslett JN, Sanoudou D, Kho AT, et al.: Gene expression comparison of biopsies from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and normal skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [2002](#), *99*(23), [15000-5](#),
- 15 Doherty KR, McNally EM: Repairing the tears: dysferlin in muscle membrane repair. *Trends Mol Med.* [2003](#), *9*(8), [327-30](#),

- 16 Davis DB, Doherty KR, Delmonte AJ, McNally EM: Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. *J Biol Chem.* 2002, *277(25)*, [22883-8](#).
- 17 Selcen D, Stilling G, Engel AG: The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology.* 2001, *56*, [1472-81](#).
- 18 Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, et al.: The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet.* 2001, *10(17)*, [1761-6](#).
- 19 Anderson LV, Harrison RM, Pogue R, et al.: Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscul Disord.* 2000, *10*, [553-9](#).
- 20 Bansal D, Miyake K, Vogel SS, et al.: Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature.* 2003, *423*, [168-72](#).
- 21 McNeil PL, Khakee R: Disruptions of muscle fibre plasma membranes. Role in exercise-induced damage. *Am J Pathol.* 1992, *140(5)*, [1097-109](#).
- 22 Clarke MS, Khakee R, McNeil PL: Loss of cytoplasmic basic fibroblast growth factor from physiologically wounded myofibres of normal and dystrophic muscle. *J Cell Sci.* 1993, *106(Pt 1)*, [121-33](#).
- 23 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. *J Biol Chem.* 2003, *50*, [50466-73](#).
- 24 Cenacchi G, Fanin M, De Giorgi LB, Angelini C: Ultrastructural changes in dysferlinopathy support defective membrane repair mechanism. *J Clin Pathol.* 2005, *58(2)*, [190-5](#).
- 25 Spuler S, Engel AG: Unexpected sarcolemmal complement membrane attack complex deposits on nonnecrotic muscle fibres in muscular dystrophies. *Neurology.* 1998, *50(1)*, [41-6](#).
- 26 Morgan BP: Regulation of the complement membrane attack pathway. *Crit Rev Immunol.* 1999, *19(3)*, [173-98](#).
- 27 Wenzel K, Zabojszcza J, Carl M, et al.: Increased susceptibility to complement attack due to down-regulation of decay-accelerating factor/CD55 in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Journal Immunol.* 2005, *175*, [6219-25](#).
- 28 Wenzel K, Carl M, Perrot A, et al.: Novel sequence variants in dysferlin-deficient muscular dystrophy leading to mRNA decay and possible C2-domain misfolding susceptibility. *Hum Mut.* 2006, *27(6)*, [599-600](#).
- 29 Hohlfeld R, Müller W, Toyka KV: Necrotizing myopathy in SJL mice. *Muscle Nerve.* 1988, *11(2)*, [184-5](#).
- 30 Weller AH, Magliato SA, Bell KP, Rosenberg NL: Spontaneous myopathy in the SJL/J mouse: pathology and strength loss. *Muscle Nerve.* 1997, *20*, [72-82](#).
- 31 Bittner RE, Anderson LV, Burkhardt E, et al.: Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Genet.* 1999, *23(2)*, [141-2](#).
- 32 Vafiadaki E, Reis A, Keers S, et al.: Cloning of the mouse dysferlin gene and genomic characterization of the SJL-Dysf mutation. *Neuroreport.* 2001, *12(3)*, [625-9](#).

- 33 Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE: Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome*. [1997](#), *8(10)*, [711-3](#),
- 34 Layfield R, Bailey K, Lowe J, Allibone R, Mayer RJ, Landon M: Extraction and protein sequencing of immunoglobulin light chain from formalin-fixed cerebrovascular amyloid deposits. *J Pathol*. [1996](#), *180(4)*, [455-9](#),
- 35 Schägger H, von Jagow G: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. [1987](#), *166(2)*, [368-79](#),
- 36 Gellermann GP, Appel TR, Tannert A, et al.: Raft lipids as common components of human extracellular amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [2005](#), *102(18)*, [6297-302](#),
- 37 Wenzel K, Geier C, Qadri F, et al.: Dysfunction of dysferlin-deficient hearts. *J Mol Med*. [2007](#), *85(11)*, [1203-14](#),
- 38 Crispens CG: Some characteristics of strain SJL-JDg mice. *Lab Anim Sci*. [1973](#), *23(3)*, [408-13](#),
- 39 Miner LL, Elmer GI, Pieper JO, Marley RJ: Aggression modulates genetic influences on morphine analgesia as assessed using a classical mendelian cross analysis. *Psychopharmacology (Berl)*. [1993](#), *111(1)*, [17-22](#),
- 40 Ho M, Post CM, Donahue LR, et al.: Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency. *Hum Mol Genet*. [2004](#), *13(18)*, [1999-2010](#),
- 41 Irwin S: Predictions of drug effects from animals to man. Hrsg.: Steinbeck H, de Reuck AVS, Knight J: *Animal behaviour and drug action*. London, Churchill, [1964](#), [268-285](#),
- 42 Irwin S: Considerations for the pre-clinical evaluation of new psychiatric drugs: a case study with phenothiazine-like tranquilizers. *Psychopharmacologia*. [1966](#), *9(4)*, [259-87](#),
- 43 Irwin S: Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia*. [1968](#), *13(3)*, [222-57](#),
- 44 Lister RG: Discussion. Hrsg.: Steinberg H, de Reuck AVS, Knight J: *Animal behaviour and drug action*. London, Churchill, [1964](#), [285](#),
- 45 Warburton DM: Commentary on: "comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse" *Psychopharmacologia* (1968) 13:222-257. *Psychopharmacology (Berl)*. [2002](#), *163(1)*, [4-8](#),
- 46 Warburton DM, Brown K: The facilitation of discrimination performance by physostigmin sulphate. *Psychopharmacologia*. [1972](#), *27(3)*, [275-84](#),
- 47 Heise GA, Conner R, Martin RA: Effects of scopolamine on variable intertrial interval spatial alternation and memory in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. [1976](#), *49(2)*, [131-7](#),
- 48 Cole BJ, Jones GH, Turner JD: 5-HT1A receptor agonists improve the performance of normal and scopolamine-impaired rats in an operant delayed matching to position task. *Psychopharmacology (Berl)*. [1994](#), *116(2)*, [135-42](#),

- 49 Gerlai R, Clayton NS: Analysing hippocampal function in transgenic mice: an ethological perspective. *Trends Neurosci.* [1999](#), *22(2)*, [47-51](#),
- 50 Sarter M, Berntson GG: Tapping artificially into natural talents. *Trends Neurosci.* [1999](#), *22(7)*, [300-2](#),
- 51 Gerlai R, Clayton NS: Reply. *Trends Neurosci.* [1999](#), *22(7)*, [301-2](#),
- 52 Nadel L: The psychobiology of spatial behaviour: The hippocampal formation and spatial mapping. Hrsg.: Alleva E, Lipp HP, Nadel L, Fasolo A, Ricceri L: Behavioral brain research in naturalistic and semi-naturalistic settings: Possibilities and Perspectives. Kluwer Academic Press [1995](#), [323-42](#),
- 53 Crawley JN, Paylor R: A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm Behav.* [1997](#), *31(3)*, [197-211](#),
- 54 Hauschka TS: Whisker-eating mice. *J Hered.* [1952](#), *43(2)*, [77-80](#),
- 55 Long SY: Hair-nibbling and whisker-trimming as indicators of social hierarchy in mice. *Anim Behav.* [1972](#), *20(1)*, [10-2](#),
- 56 Gold LH: Hierarchical strategy for phenotypic analysis in mice. *Psychopharmacology (Berl.)*. [1999](#), *147(1)*, [2-4](#),
- 57 Gold LH: Integration of molecular biological techniques and behavioural pharmacology. *Behav Pharmacol.* [1996](#), *7(7)*, [589-615](#),
- 58 Rogers DC, Jones DN, Nelson PR, et al.: Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains. *Behav Brain Res.* [1999](#), *105(2)*, [207-17](#),
- 59 Rafael JA, Nitta Y, Peters J, Davies KE: Testing of SHIRPA, a mouse phenotypic assessment protocol, on Dmd(mdx) and Dmd(mdx3cv) dystrophin-deficient mice. *Mamm Genome.* [2000](#), *11(9)*, [725-8](#),
- 60 Nolan PM, Peters J, Vizor L, et al.: Implementation of a large-scale ENU mutagenesis program: towards increasing the mouse mutant resource. *Mamm Genome.* [2000](#), *11(7)*, [500-6](#),
- 61 van der Staay FJ, Steckler T: Behavioural phenotyping of mouse mutants. *Behav Brain Res.* [2001](#), *125(1-2)*, [3-12](#),
- 62 Rogers DC, Peters J, Martin JE, et al.: SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neurosci Lett.* [2001](#), *306(1-2)*, [89-92](#),
- 63 Gerlai R: Phenomics: fiction or the future?. *Trends Neurosci.* [2002](#), *25(10)*, [506-9](#),
- 64 Pachner AR, Kantor FS: Nerve stimulation test in murine experimental autoimmune myasthenia gravis. *Ann Neurol.* [1982](#), *11(1)*, [48-52](#),
- 65 Jones BJ, Roberts DJ: The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol.* [1968](#), *20(4)*, [302-4](#),
- 66 Howland DS, Liu J, She Y, et al.: Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A.* [2002](#), *99(3)*, [1604-9](#),



- 67 Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ: X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [1984](#), *81(4)*, [1189-92](#),
- 68 Dangain J, Vrbová G: Muscle development in mdx mutant mice. *Muscle Nerve*. [1984](#), *7(9)*, [S.700-4](#),
- 69 Torres LF, Duchen LW: The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain*. [1987](#), *110(Pt 2)*, [269-99](#),
- 70 Muntoni F, Mateddu A, Serra G: Passive avoidance behaviour deficit in the mdx mouse. *Neuromuscul Disord*. [1991](#), *1(2)*, [121-3](#),
- 71 Muntoni F, Mateddu A, Marchei F, Clerk A, Serra G: Muscular weakness in the mdx mouse. *J Neurol Sci*. [1993](#), *120(1)*, [71-7](#),
- 72 Lefaucheur JP, Pastoret C, Sebille A: Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat Rec*. [1995](#), *242(1)*, [70-6](#),
- 73 Vaillend C, Redon A, Misslin R, Ungerer A: Influence of dystrophin-gene mutation on mdx mouse behavior. I. Retention deficits at long delays in spontaneous alternation and bar-pressing tasks. *Behav Genet*. [1995](#), *25(6)*, [569-79](#),
- 74 Heimann P, Augustin M, Wieneke S, Heising S, Jockusch H: Mutual interference of myotonia and muscular dystrophy in the mouse: a study on ADR-MDX double mutants. *Neuromuscul Disord*. [1998](#), *8(8)*, [551-60](#),
- 75 Coccorello R, Castellano C, Paggi P, Mele A, Oliverio A: Genetically dystrophic mdx/mdx mice exhibit decreased response to nicotine in passive avoidance. *Neuroreport*. [2002](#), *13(9)*, [1219-22](#),
- 76 Han JJ, Carter GT, Ra JJ, Abresch RT, Chamberlain JS, Robinson LR: Electromyographic studies in mdx and wild-type C57 mice. *Muscle Nerve*. [2006](#), *33(2)*, [208-14](#),
- 77 Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW: Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [1995](#), *92(3)*, [689-93](#),
- 78 Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME, Kopito RR: Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [2000](#), *97(23)*, [12571-6](#),
- 79 Anderson JE, Ovalle WK, Bressler BH: Electron microscopic and autoradiographic characterization of hindlimb muscle regeneration in the mdx mouse. *Anat Rec*. [1987](#), *219(3)*, [243-57](#),
- 80 Tanabe Y, Esaki K, Nomura T: Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol*. [1986](#), *69(1-2)*, [91-5](#),
- 81 Carnwath JW, Shotton DM: Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci*. [1987](#), *80(1)*, [39-54](#),
- 82 Karpati G, Carpenter S, Prescott S: Small-caliber skeletal muscle fibres do not suffer necrosis in mdx mouse dystrophy. *Muscle Nerve*. [1988](#), *11(8)*, [795-803](#),

- 83 Woo M, Tanabe Y, Ishii H, Nonaka I, Yokoyama M, Esaki K: Muscle fibre growth and necrosis in dystrophic muscles: a comparative study between dy and mdx mice. *J Neurol Sci.* [1987](#), *82(1-3)*, [111-22](#),
- 84 Nemoto H, Konno S, Nakazora H, Miura H, Kurihara T: Histological and immunohistological changes of the skeletal muscles in older SJL/J mice. *Eur Neurol.* [2007](#), *57(1)*, [19-25](#),
- 85 Cooper BJ: Animal models of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Br Med Bull.* [1989](#), *45(3)*, [703-18](#),
- 86 Benditt EP, Eriksen N, Hermodson MA, Ericsson LH: The major proteins of human and monkey amyloid substance: Common properties including unusual N-terminal amino acid sequences. *FEBS Lett.* [1971](#), *19(2)*, [169-73](#),
- 87 Ein D, Kimura S, Terry WD, Magnotta J, Glenner GG: Amino acid sequence of an amyloid fibril protein of unknown origin. *J Biol Chem.* [1972](#), *247(17)*, [5653-5](#),
- 88 Levin M, Franklin EC, Frangione B, Pras M: The amino acid sequence of a major nonimmunoglobulin component of some amyloid fibrils. *J Clin Invest.* [1972](#), *51(10)*, [2773-6](#),
- 89 Husby G, Sletten K, Michaelsen TE, Natvig JB: Alternative, non-immunoglobulin origin of amyloid fibrils. *Nat New Biol.* [1972](#), *238(84)*, [187](#),
- 90 Benditt EP, Eriksen N: Chemical classes of amyloid substance. *Am J Pathol.* [1971](#), *65(1)*, [231-52](#),
- 91 Sletten K, Husby G: The complete amino-acid sequence of non-immunoglobulin amyloid fibril protein AS in rheumatoid arthritis. *Eur J Biochem.* [1974](#), *41(1)*, [117-25](#),
- 92 Benditt EP, Eriksen N, Berglund C: Some observations relevant to the chemical composition and a possible subunit structure of the fibrils of amyloid substance. Hrsg.: Mandema E, Ruinen L, Scholten FH, Cohen AS: Behavioral Amyloidosis. *Excerpta medica* [1968](#), [206-15](#),
- 93 Glenner GG, Anders RF, Terry WD: Sequence studies of amyloid protein. *Proc Austral Biochem Soc.* [1973](#), *6*, [72](#),
- 94 Husby G, Sletten K, Michaelsen TE, Natvig JB: Amyloid fibril protein subunit, "protein AS": distribution in tissue and serum in different clinical types of amyloidosis including that associated with myelomatosis and Waldenström's macroglobulinemia. *Scand J Immunol.* [1973](#), *2(4)*, [395-404](#),
- 95 Spuler S, Carl M, Zabojszcza J, et al.: Dysferlin-deficient muscular dystrophy features amyloidosis. *Ann Neurol.* [2008](#), *63(3)*, [323-8](#),
- 96 Cashman JR, Ghirmai S, Abel KJ, Fiala M: Immune defects in Alzheimer's disease: new medications development. *BMC Neurosci.* [2008](#), *9(2)*, [S13](#),
- 97 Basta M, Van Goor F, Luccioli S, et al.: F(ab)'2-mediated neutralization of C3a and C5a anaphylatoxins: a novel effector function of immunoglobins. *Nat Med.* [2003](#), *9(4)*, [431-8](#),
- 98 The Jackson Laboratories: Strain name: SJL/J. Hrsg.: The Jackson Laboratories: JAX mice database. [01.08.2008](#) <http://jaxmice.jax.org/strain000686.html>.
- 99 Brodtkin ES, Goforth SA, Keene AH, Fossella JA, Silver LM: Identification of quantitative trait loci that affect aggressive behavior in mice. *J Neurosci.* [2002](#), *22(3)*, [1165-70](#),

- 100 von der Hagen M, Laval SH, Cree LM, et al.: The differential gene expression profiles of proximal and distal muscle groups are altered in pre-pathological dysferlin-deficient mice. *Neuromuscul Disord.* [2005](#), *15(12)*, [863-77](#),
- 101 Schmidt S, Vieweger A, Obst M et al.: Dysferlin-deficient muscular dystrophy: gadofluorine M suitability at MR imaging in a mouse model. *Radiology.* [2009](#), *250(1)*, [87-94](#),
- 102 Unger EC: Can a newer MR contrast agent be used to monitor disease progression in muscular dystrophy?. *Radiology.* [2009](#), *250(1)*, [1-3](#),

## 10 Anhang

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Altersverteilung der untersuchten SJL/J-Mäuse.....	19
Abb. 2: Altersverteilung der untersuchten C57BL/6-Mäuse.....	20
Abb. 3: Auftragung des Gewichts über der Zeit (Alter); (A) SJL/J-Mäuse, (B) C57BL/6-Mäuse. ....	22
Abb. 4: Verteilung der Gewichtswerte in den verschiedenen Gruppen.....	23
Abb. 5: Trichrome-Färbung des Muskels von SJL/J-Mäusen. (A) 12 Wochen alte Maus. Die Pfeile markieren zentralisierte Kerne. (B) 33 Wochen alte Maus. Die kleinen dicken Pfeile zeigen zentralisierte Kerne, der dicke lange Pfeil zeigt Fasersplitting, der dünne lange Pfeil eine nekrotische Faser.....	25
Abb. 6: Trichrome-Färbung des Muskels einer 33 Wochen alten C57BL/6-Maus.....	25
Abb. 7: Congorotfärbung des Herzmuskels einer 43 Wochen alten SJL/J-Maus. Die Pfeile zeigen auf das Amyloid.....	26
Abb. 8: Auftragung der Fasersplittings pro 100 Fasern über der Zeit (Alter). (A) SJL/J-Mäuse. (B) C57BL/6-Mäuse.....	27
Abb. 9: Verteilung der Fasersplittingwerte in den verschiedenen Gruppen.....	28
Abb. 10: Auftragung der zentralisierten Kerne pro 100 Fasern. (A) SJL/J-Mäuse. (B) C57BL/6-Mäuse.....	29
Abb. 11: Verteilung der Anzahl an zentralisierten Kernen pro 100 Fasern in den einzelnen Gruppen.....	30
Abb. 12: Die Auftragung der nekrotischen Fasern pro 100 Fasern über der Zeit (Alter). (A) SJL/J-Mäuse. (B) C57BL/6-Mäuse.....	31
Abb. 13: Verteilung der Anzahl an nekrotischen Fasern pro 100 Fasern in den verschiedenen Gruppen.....	32
Abb. 14: Beispiele für die Bewertung von entzündlichem Infiltrat und Fetteinlagerung. (A)-(D) Trichrome-Färbungen des M. quadriceps femoris verschieden alter Mäuse aus beiden Gruppen. (A) Muskelschnitt einer 6 Wochen alten C57BL/6-Maus. (B) Muskelhistologie einer 31 Wochen alten C57BL/6-Maus. (C) Muskelhistologie einer 31 Wochen alten SJL/J-Maus. (D) Dystrophes Muskelgewebe einer 43 Wochen alten SJL/J-Maus.....	34
Abb. 15: Veränderung des Minimalwertes in Abhängigkeit vom Alter. (A) SJL/J-Mäuse. (B) C57BL/6-Mäuse.....	36
Abb. 16: Verteilung der minimalen Durchmesser in den einzelnen Mausgruppen.....	37
Abb. 17: Auftragung der maximalen Durchmesser über der Zeit (Alter). (A) SJL/J-Mäuse. (B) C57BL/6-Mäuse.....	38
Abb. 18: Verteilung der maximalen Faserdurchmesser in den verschiedenen Mausgruppen.....	39
Abb. 19: Auftragung der Mittelwerte der Faserdurchmesser über der Zeit (Alter). (A) SJL/J-Mäuse. (B) C57BL/6-Mäuse.....	40
Abb. 20: Verteilung der Mittelwerte der Faserdurchmesser in den einzelnen Altersgruppen.....	41
Abb. 21: (A) Muskelproben wurden von den SJL/J-Mäusen gewonnen, nachdem sie mit Anti-C5-AK (links), Isotypenkontrolle (rechts) oder Albumin (Mitte) behandelt worden waren.....	42

## 10.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Material und Bestellnummern.....	11
Tab. 2: Übersicht über die Qualität der klinischen Tests. ....	14
Tab. 3: Übersicht über die Qualität der histologischen Methoden.....	17
Tab. 4: Resultate der klinischen Tests in Abhängigkeit von Alter und Genetik.....	21
Tab. 5: Resultate der Untersuchung auf entzündliches Infiltrat und Fetteinlagerung in Abhängigkeit von Genetik und Alter.....	35

## **11 Danksagung**

Die Arbeit wurde in der Neurologischen Klinik und im Experimental and Clinical Research Center der Charité Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

An erster Stelle möchte ich Frau Professor S. Spuler herzlichst danken für die Übernahme und Betreuung meiner thematischen Fragestellung.

Für die Hilfe bei der Charakterisierung des Amyloids möchte ich Herrn Professor C. Röcken danken.

Monika Schaerig gilt mein Dank für die tatkräftige Unterstützung bei der klinischen Untersuchung der Mäuse.

Die statistische Auswertung wäre ohne Semjon Taubert nicht annähernd so leicht und zufriedenstellend gelungen.

Für das Korrekturlesen möchte ich mich bei Claudia Vieweger bedanken.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Familie, Familie Degel sowie insbesondere meinem Partner, Christopher Degel, für ihre stete Unterstützung danken.

## **12 Lebenslauf**

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

## 13 Eidesstattliche Erklärung

Name: Antje Friederike Henriette Caroline Vieweger  
Geburtstag: 04.02.1978  
Geburtsort: Berlin  
Adresse: Brunowstr. 49, 13507 Berlin

Hiermit erkläre ich, Antje Vieweger, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema: `Verlauf der Muskeldystrophie bei der Dysferlin-defizienten SJL/J-Maus´ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen sowie ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter angefertigt habe. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials wurde ich von Professor Dr. med. Simone Spuler unterstützt. Die vorliegende Arbeit enthält auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten.

Ich versichere, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht und mit der vorliegenden Abhandlung an keiner anderen Hochschule die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb eines akademischen Grades beantragt habe. Mir ist die geltende Promotionsordnung der medizinischen Fakultät bekannt. Ich habe weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Datum

Unterschrift