

Aus dem Friedrich-Baur-Institut der Medizinischen Fakultät  
an der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
(Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich)  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

# **Neue Strategien molekularer Therapien bei der Duchenne Muskeldystrophie**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Cordula Pertl  
aus  
Traunstein  
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Maggie C. Walter, M.A.

Mitberichterstatter: Prof: Dr. Wolfgang Müller-Felber  
Prof. Dr. Roland Kappler  
Priv. Doz. Dr. Burkhard Rolf

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Christian Thirion  
Priv.-Doz. Dr. med. Dr. phil. Sabine Krause

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2013

meinen Eltern

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:**

**Pertl, C.\***, Giacomotto, J.\*, Borrel, C., Walter, M.C., Bulst, S., Johnsen, B., Baillie, D.L., Lochmüller, H., Thirion, C., Ségalat, L. (2009) "Evaluation of the therapeutic potential of carbonic anhydrase inhibitors in two animal models of dystrophin deficient muscular dystrophy." Hum Mol Genet **18**: 4089-4101.

**Pertl, C.**, Eblenkamp, M., Pertl, A., Pfeifer, S., Wintermantel, E., Lochmüller, H., Walter, M.C., Krause, S., Thirion, C. (2012) "A new web-based method for automated analysis of muscle histology." BMC Musculoskelet Disord **14**: 26.

**Pertl, C.**, Pertl, A., Thirion, C., Stucka, R., Patterson, C., Walter, M.C., Krause, S., Lochmüller, H. (2012) "Reduction of the E3/E4 ligase Chip ameliorates functional and morphological signs of muscular dystrophy in dystrophin-deficient mice." Am J Pathol, eingereicht

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis		I
Zusammenfassung		1
1	Einleitung	5
1.1	Pathologie der Duchenne Muskeldystrophie	5
1.1.1	Genetische Ursachen und Krankheitsbild der Duchenne Muskeldystrophie	5
1.1.2	Gegenüberstellung der Becker und Duchenne Muskeldystrophie	6
1.2	Molekulare Grundlagen der Duchenne Muskeldystrophie	8
1.2.1	Dystrophin	8
1.2.2	Der Dystrophin-assoziierte Proteinkomplex (DAPC)	10
1.2.3	Utrophin	14
1.3	Therapieforschung und -entwicklung	16
1.3.1	Tiermodelle für DMD	16
1.3.1.1	<i>mdx</i> -Maus	16
1.3.1.2	Kanine und feline Modelle für DMD	17
1.3.1.3	Weitere Tiermodelle	19
1.3.2	Molekulare Therapie für DMD	20
1.3.2.1	Modifikation des Dystrophin mRNA-Spleißens: Exon skipping	21
1.3.2.2	Proteinersatztherapie	23
1.3.2.3	Glukokortikosteroidtherapie der Duchenne Muskeldystrophie	27
1.3.2.4	Zellbasierte Strategien	30
2	Zielsetzung: Neue Ansätze für die molekulare Therapie bei der DMD	34
2.1	Präklinische Validierung zweier Carboanhydrase-Inhibitoren in der <i>mdx</i> -Maus	34
2.2	Entwicklung eines neuen Mausmodells ( <i>dys</i> <sup>-/-</sup> / <i>chip</i> <sup>-/-</sup> bzw. <i>dys</i> <sup>-y</sup> / <i>chip</i> <sup>-/-</sup> )	36
3	Material und Methoden	40
3.1	Versuchstiere und -haltung	40
3.2	Isometrische Muskelkraftmessung	40
3.3	Muskelhistologische Untersuchung	43
3.3.1	Histochemie und Immunohistochemie	43
3.3.2	Automatisierte quantitative Analyse verschiedener histologischer Parameter	43
3.4	Statistische Auswertung	45
3.5	Präklinische Validierung zweier Carboanhydrase-Inhibitoren in der <i>mdx</i> -Maus	46
3.5.1	Behandlung der <i>mdx</i> -Mäuse mit den Carboanhydraseinhibitoren	46

3.5.2	Histologische Untersuchungen und isometrische Muskelkraftmessung	46
3.5.2.1	Histochemie und Immunohistochemie	46
3.5.2.2	Automatisierte histologische Analyse der Muskelschnitte	46
3.5.2.3	Isometrische Muskelkraftmessung	47
3.6	Entwicklung eines neuen Mausmodells ( <i>dys<sup>-/-</sup>/chip<sup>-/-</sup></i> bzw. <i>dys<sup>-y</sup>/chip<sup>-/-</sup></i> )	47
3.6.1	Zucht und Genotypisierung	47
3.6.2	Charakterisierung der Inzucht- und Auszuchtlinie	51
3.6.2.1	Proteinextraktion aus Muskelgewebe und Western Blot Analyse	51
3.6.2.2	Histochemische und Immunhistochemische Untersuchungen	52
3.6.2.3	Automatisierte quantitative Analyse des Anteils an fibrotischem Muskelgewebe	54
3.6.2.4	Isometrische Muskelkraftmessung	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Präklinische Validierung zweier Carboanhydrase-Inhibitoren in der <i>mdx</i> -Maus	56
4.1.1	Histochemie und Immunhistologie	56
4.1.2	Isometrische Muskelkraftmessung	59
4.2	Entwicklung eines neuen Mausmodells ( <i>dys<sup>-/-</sup>/chip<sup>-/-</sup></i> bzw. <i>dys<sup>-y</sup>/chip<sup>-/-</sup></i> )	62
4.2.1	Charakterisierung der Aus- und Inzuchtlinie	62
4.2.1.1	Zucht und Sterblichkeit der Mauslinie <i>dys<sup>-/-</sup>/chip<sup>-/-</sup></i> bzw. <i>dys<sup>-y</sup>/chip<sup>-/-</sup></i>	62
4.2.1.2	Gewichtsentwicklung und Lebensalter in der Auszuchtlinie	62
4.2.1.3	Gewicht, Größe und Lebensalter in der Inzuchtlinie	63
4.2.2	Funktionelle und biochemische Charakterisierung der Inzucht-Mauslinie	64
4.2.2.1	Isometrische Muskelkraftmessung	64
4.2.2.2	Western Blot Analyse	70
4.2.2.3	Histochemie und Immunhistologie	75
5	Diskussion	84
5.1	Präklinische Validierung zweier Carboanhydrase-Inhibitoren in der <i>mdx</i> -Maus	84
5.1.1	Wirkung von MTZ und DCPM auf <i>C. elegans</i>	84
5.1.2	Wirkung von MTZ und DCPM auf das <i>mdx</i> -Mausmodell	84
5.1.3	Fazit und Ausblick	87
5.2	Entwicklung eines neuen Mausmodells ( <i>dys<sup>-/-</sup>/chip<sup>-/-</sup></i> bzw. <i>dys<sup>-y</sup>/chip<sup>-/-</sup></i> )	89
5.2.1	Zucht der Knockoutmutante ( <i>dys<sup>-/-</sup>/chip<sup>-/-</sup></i> bzw. <i>dys<sup>-y</sup>/chip<sup>-/-</sup></i> )	89
5.2.2	Funktionelle und biochemisch Charakterisierung der Knockoutmutante	91
5.2.3	Fazit und Ausblick	102
	Literaturverzeichnis	105
	Anhang	122

Abkürzungsverzeichnis	122
Danksagung	126
Veröffentlichungen	127
Poster	127
Ehrenwörtliche Erklärung	128

## Zusammenfassung

Die großen medizinischen Errungenschaften der letzten beiden Jahrhunderte führten dazu, dass eine Vielzahl von Erkrankungen, darunter vor allem Infektionskrankheiten, an Schrecken verloren haben. Dennoch konnte für eine große Anzahl an genetischen Erkrankungen noch keine wirksame Behandlung gefunden werden. Die Ursachen für diese Erkrankungen liegen in vererbten oder spontan auftretenden Mutationen, die den vollständigen Verlust oder eine Fehlfunktion eines lebensnotwendigen Genproduktes mit sich bringt. Eine mögliche Therapie einer solchen genetischen Erkrankung erfordert die Wiederherstellung der fehlenden Funktion. Das Ziel dieser Arbeit war es, zwei Strategien einer molekularen Therapie für die Duchenne Muskeldystrophie (DMD) zu untersuchen. DMD stellt eine schwerwiegende Erkrankung dar, bei der es zu einem Muskelschwund kommt, der aufgrund von Herz- und Lungenversagen zum Tode führt. Die ursächliche Mutation ist auf dem X-Chromosom im Dystrophinogen lokalisiert, weshalb insbesondere Jungen betroffen sind. Zurzeit besteht noch keine Möglichkeit einer kausalen Therapie. Diese Arbeit stellt wichtige Einblicke in mögliche Therapiestrategien für die DMD zur Verfügung, welche für zukünftige Forschungsprojekte und klinische Studien von Nutzen sein können.

Die hier verfolgten Therapiestrategien basieren auf Erkenntnissen, die in einer Mutante des Nematoden *C. elegans* gewonnen wurden. Hierbei handelte es sich um die Mutante *dys-1; hlh-1*. In diesem Modell entwickelte der Wurm mit einer Mutation des *dys-1* Gens in Verbindung mit einer milden *MyoD*-Mutation einen muskeldegenerativen, annähernd unbeweglichen Phänotyp (Gaud *et al.*, 2004; Segalat, 2006; Segalat, 2007). Die erste Strategie zur Therapie von DMD beruht auf den Ergebnissen eines Medikamentenscreens, der mehr als 1000 zugelassene Medikamente umfasste. Im dystrophen Nematodenmodell sollten Moleküle identifiziert werden, die fähig sind den dystrophen Phänotyp zu verbessern. Zwei von etwa 20 wirksamen Substanzen, Dichlorophenamid (DCPM) und Methazolamid (MTZ), wurden in der vorliegenden Arbeit im Dystrophin-defizienten *mdx*-Mausmodell darauf getestet, ob sie auch im höheren Tiermodell für die DMD (*mdx*-Maus) eine Verbesserung des dystrophen Phänotyps bewirken können. Dichlorophenamid und Methazolamid sind Carboanhydraseinhibitoren der Klasse der Sulfonamide (Supuran *et al.*, 2003).

Die zweite Strategie stützt sich auf Untersuchungen, die ebenfalls in dieser annähernd unbeweglichen *C. elegans* Doppelmutante *dys-1; hlh-1* erfolgten. So wurde ein Gen identifiziert, das an der Regulation des Muskelproteinabbaus beteiligt ist (Nyamsuren *et*

*al.*,2007). Das Gen kodiert die E3/E4 Polyubiquitinligase CHN-1, die an der Regulation des Abbaus sarkomerer Proteine mitwirkt. Das humane Homolog zu CHN-1 ist CHIP (carboxyl terminus of the Hsp70-interacting protein). Der Knockout von *chn-1* konnte im Wurm den unbeweglichen Phänotyp verbessern (Nyamsuren *et al.*,2007). Diese Erkenntnisse bildeten die Grundlage für die Etablierung eines neuen Mausmodells, welches zusätzlich zum *mdx*-Hintergrund einen *chip*-Knockout aufweist. Das neue Mausmodell (*dys<sup>-/-</sup>/chip<sup>-/-</sup>* bzw. *dys<sup>ly</sup>/chip<sup>-/-</sup>*) sollte dazu dienen, die Reduktion des Proteinabbaus im Muskel durch den Knockout der muskelspezifischen E3/E4-Ligase CHIP (C-terminus of Hsp70-interacting protein) zu untersuchen. Sollten diese Untersuchungen in diesem neuen Mausmodell erfolgversprechende Ergebnisse liefern, dann könnte künftig eine Herunterregulierung der E3/E4-Ligase CHIP für den Einsatz im Patienten in Erwägung gezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, in wie weit die Effekte, die im Nematodenmodell beobachtet wurden, im höheren Tiermodell auftreten und ob sich dort Erkenntnisse für eine spätere Anwendung dieser Strategien im Patienten gewinnen lassen. Dazu wurden die kontraktile Eigenschaften der Muskeln mittels einer auf funktioneller Ebene des Muskels erfolgenden isometrischen Muskelkraftmessung im *M. extensor digitorum longus* der behandelten Mäuse sowie der entsprechenden Kontrollmäuse durchgeführt.

Des Weiteren sollten die Effekte der Behandlung mit den Carboanhydraseinhibitoren bzw. des *chip*-Knockouts auf histopathologische Merkmale des dystrophen Muskels charakterisiert werden. Dazu wurde ein Bildanalyseesystem entwickelt, mit dem die Parameter Faseranteil mit zentral lokalisierten Zellkernen und Feret's Durchmesser der Muskelfaser automatisch ermittelt werden können. In der *dys<sup>-/-</sup>/chip<sup>-/-</sup>* bzw. *dys<sup>ly</sup>/chip<sup>-/-</sup>*-Knockoutmaus wurde darüber hinaus der Anteil an fibrotischem Gewebe im Muskelquerschnitt über ein weiteres automatisiertes Bildanalyseesystem bestimmt. Der Fasertypenanteil und die oxidative Kapazität der Muskelfasern wurden in der Knockoutmaus ebenfalls untersucht.

Zur Untersuchung der Wirksamkeit der Carboanhydraseinhibitoren Dichlorophenamid und Methazolamid wurden diese Substanzen über 120 Tage lang an *mdx*-Mäuse verfüttert. Dabei wurde Dichlorophenamid in einer 5- und 20-fachen Dosierung (5x DCPM bzw. 20x DCPM) und Methazolamid in einer 1- und 5-fachen Dosierung (1x MTZ bzw. 5x MTZ) eingesetzt. Für beide Substanzen wurde in der höheren Dosierung eine Abnahme der Resistenz der Muskelfasern gegenüber exzentrischen Kontraktionen in der isometrischen Muskelkraftmessung gezeigt. Es konnte auch eine erhöhte spezifische tetanische Muskelkraft beobachtet werden. Dabei besitzt 5x MTZ das bessere Profil, da hier der mittlere Kraftabfall

annähernd konstant in der Kontrollgruppe und in den behandelten Tieren ist. Die histologischen Untersuchungen waren nur für die 5x MTZ-behandelten Muskeln möglich, da die Muskeln aus der Behandlung mit Dichlorophenamid keine ausreichende Qualität für die automatische Auswertung aufwiesen. Im 5x MTZ-behandelten *M. tibialis anterior* nahm der Faseranteil mit zentral lokalisierten Zellkernen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ab, während die Fasergrößenvariabilität zunahm. Auch erhöhte sich die Anzahl an kleinen Fasern. Im Diaphragma dagegen konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Ein größerer Varianzoeffizient und die höhere Anzahl an kleinen Fasern sprechen für eine zunehmende Degeneration des Muskels. Dem widerspricht jedoch die Tatsache, dass der Anteil an Fasern mit zentral lokalisierten Zellkernen geringer geworden ist. Funktionell spricht auch die geringere Resistenz des *M. extensor digitorum longus* in der isometrischen Muskelkraftmessung für eine Verschlechterung der Membranintegrität.

Dies macht deutlich, dass ein *C. elegans* Screen gekoppelt mit einer Validierung im Mausmodell zur Identifikation und Charakterisierung potentieller Medikamente gegen seltene Krankheiten sinnvoll ist, da Unterschiede der Modellphysiologie verschiedener Spezies unterschiedliche Ergebnisse bedingen, die man beim Vergleich zweier Modelle beachten muss. Für die Sulfonamide DCPM und MTZ glauben wir nicht, dass weitere präklinische Untersuchungen für die Behandlung von DMD erfolgen werden. Jedoch könnte die Entwicklung von isoenzymspezifischen oder zumindest organselektiven CA Inhibitoren höchst nützlich sein, um deren Wirksamkeit zur Behandlung von DMD zu verbessern.

Zur Entwicklung des Mausmodells einer *dys<sup>-/-</sup>/chip<sup>-/-</sup>*- bzw. *dys<sup>-/y</sup>/chip<sup>-/-</sup>*-Knockoutmaus wurden weibliche *mdx*-Mäuse mit männlichen *chip<sup>+/-</sup>*-Mäusen gekreuzt. Ab der F2-Generation wurden zwei Zuchtansätze verfolgt, wobei zum einen nur Wurfgeschwister weiterverpaart wurden und zum anderen nur Tiere verpaart wurden, die aus Würfen verschiedener Elterntiere stammten. Obwohl es sich hierbei um keine vollständige In- bzw. Auszucht handelt, sollen die beiden Zuchtansätze dennoch der Einfachheit halber so bezeichnet werden. Nur die Inzucht lieferte eine kleine Anzahl an homozygoten Knockoutmäusen, welche zusammen mit den heterozygoten Geschwistertieren einen Einblick in den Einfluss des *chip*-Knockouts auf den *mdx*-Phänotyp ermöglichten. Die Muskelfasern der *chip*-Knockoutmäuse wiesen Veränderungen in ihren kontraktiven Eigenschaften und ihrer Resistenz gegenüber Ermüdung des Muskels, in ihrem Stoffwechsel der Fasern, ihrer Fasergröße und ihrem Degenerations- und Regenerationsgrad auf. Dabei wurde eine Verschiebung in Richtung hin zu Eigenschaften langsamer Muskelfasern festgestellt. Sie zeigen neben einer verbesserten Muskelausdauer gegenüber den Kontrollmäusen auch einen geringeren Anteil an Fasern mit zentral lokalisierten

Zellkernen und eine erhöhte oxidative Kapazität der Muskelfasern. Auf Proteinebene wurden die Expressionsmuster verschiedener Marker untersucht, welche Einflüsse des *chip*-KO auf die Membranintegrität ( $\alpha$ -Aktinin-2,  $\alpha$ -Dystroglykan, Utrophin) und auf Signalwege, welche den Metabolismus der Muskelfasern regulieren können ( $\alpha$ -Aktinin-2, Calsarcin-2, Myogenin, p53), widerspiegeln. So wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt, dass der *chip*-KO im *mdx*-Hintergrund einen verbesserten Ausdauerphänotyp im Vergleich zur Kontrolle zur Folge hatte. Aufgrund der Expressionsmuster der untersuchten Marker und aufgrund der histologischen Befunde gehen wir davon aus, dass der *chip*-KO direkt oder indirekt zur Aktivierung des Calcineurin-Signalweges führt, welcher den oxidativen Stoffwechsel in den Muskelfasern erhöht. Der genaue Mechanismus konnte hier jedoch nicht aufgeklärt werden.

Die hohe Sterblichkeit, die wir in den homozygoten Knockoutmäusen beobachtet haben, erschwert den Einsatz dieses Mausmodells. Jedoch wiesen die heterozygoten Knockoutmäuse eine normale Lebenserwartung und Fitness auf, weshalb für die weitere Forschung auf diese Tiere zurückgegriffen werden sollte. Ziel dieser Arbeit war es schließlich, die Wirksamkeit eines CHIP-spezifischen Therapieansatzes für eine spätere Umsetzung im Patienten zu untersuchen. Ein vollständiger Knockout von CHIP sollte nicht angestrebt werden. Ein möglicher muskelspezifischer adenoviraler Knockdown von *chip* im Menschen wäre denkbar. Deshalb stellen die heterozygoten Knockoutmäuse ein geeignetes Mausmodell für weitere Untersuchungen dieses Therapieansatzes einer CHIP-Reduktion im dystrophen Muskel dar.

In dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Reduktion von CHIP nicht geeignet ist, um die dystrophe Pathophysiologie kausal zu therapieren, da die Effekte vermutlich eher auf der Aktivierung des Calcineurin-Signalweges beruhen, die einen Ausdauerphänotyp fördern und dadurch den dystrophen Phänotyp abmildern können. Zur Aktivierung dieses Signalweges muss jedoch nicht der Umweg über eine CHIP-Reduktion gegangen werden, da dies offensichtlich schwerwiegende Nebenwirkungen mit sich bringt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Pathologie der Duchenne Muskeldystrophie

### 1.1.1 Genetische Ursachen und Krankheitsbild der Duchenne Muskeldystrophie

Die Muskeldystrophie Duchenne (DMD; OMIM 310200) wurde zuerst von Duchenne (Duchenne,1868) und Gowers (Gowers,1879) beschrieben. Dabei handelt es sich um eine Erkrankung mit fortschreitender Muskeldegeneration, welche durch Mutationen des Dystrophingens, das auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, hervorgerufen wird. Dadurch kommt es entweder nur zur Bildung von nicht-funktionellem oder zum vollständigen Fehlen des 427-kDa Zytoskelett-Proteins Dystrophin. DMD geht häufig mit Entwicklungs- und Verhaltensstörungen einher und zählt zu den häufigsten vorherrschenden rezessiv vererbten neuromuskulären Erkrankungen. Etwa 1 von 3500 Jungen ist betroffen (Blake *et al.*,2002). Erkrankte Jungen entwickeln erst zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr klinische Symptome der Erkrankung. Diese Kinder beginnen später zu laufen, haben Schwierigkeiten Treppen zu steigen und weisen einen watschelnden Gang auf (Dubowitz,1978). Charakteristisches Merkmal für die Anpassung der Jungen an die Muskelschwäche stellt das Gowers-Zeichen dar. Dabei stützt sich der Patient mit seinen Armen auf seinen Schenkeln ab, um sich aufzurichten. Das typische Erscheinungsbild der Muskeldegeneration bei der Duchenne Muskeldystrophie zeichnet sich aus durch eine pseudohypertrophe Wadenmuskulatur, während alle proximalen Muskeln atrophieren. Durchschnittlich sind die Patienten im zweiten Lebensjahrzehnt rollstuhlpflichtig und benötigen sehr bald spezielle Atemhilfen für die Nacht. Ohne diese nicht-invasive nächtliche Beatmung führen Lungen- und Herzversagen bereits im zweiten Lebensjahrzehnt zum Tod. Trotz der Einführung dieser Atemhilfen versterben Patienten aufgrund des schwerwiegenden Verlustes der Muskelfunktion während des dritten und vierten Lebensjahrzehnts.

Neben der offensichtlichen Rolle von Dystrophin bei der Gewährleistung der Muskelfunktion spielt es jedoch auch eine wichtige Rolle im Gehirn. Dies zeigt sich darin, dass ein beachtlicher Anteil der Patienten mit einer Duchenne Muskeldystrophie eine nichtfortschreitende kognitive Beeinträchtigung aufweist (Bresolin *et al.*,1994; Blake *et al.*,2000; Mehler,2000; Daoud *et al.*,2009).

Histologische Untersuchungen einer Skelettmuskelbiopsie eines DMD-Patienten weisen eine Erhöhung der Faserkalibervariation, eine Anhäufung nekrotischer Fasern und eine Zunahme zentral lokalisierter Zellkerne in regenerierenden Fasern auf. Darüber hinaus werden das

Auftreten von Fibrose und eine Einwanderung von Makrophagen und CD4+ Lymphozyten beobachtet (McDouall *et al.*,1990; Gorospe *et al.*,1992; Blake *et al.*,2002). Der stark progressive Charakter der Duchenne Muskeldystrophie beruht darauf, dass der betroffene Muskel nicht mehr fähig ist, die geschädigten Muskelfasern zu ersetzen. Hierzu trägt die sich erschöpfende Kapazität der Muskelvorläuferzellen, wie z.B. Satellitenzellen, bei, unentwegt neue Fasern zu bilden. Zusätzlich wird das Muskelgewebe allmählich durch Binde- und Fettgewebe ersetzt (Reimann *et al.*,2000). Eine starke Erhöhung der Serumkreatinphosphokinaseaktivität dient als diagnostischer Marker für die Schädigung der Skelettmuskelfasern. Eindeutig wird DMD über das Fehlen von Dystrophin in Muskelbiopsien oder die molekulare Identifikation einer Mutation des Dystrophingens diagnostiziert. Der Großteil der identifizierten Mutationen stellen mit 65% große Deletionen dar. Diese Patienten weisen einen Verlust von einem oder mehreren Exons auf. Diese liegen in zwei „hot spots“ für Deletionen am 5'-Ende bzw. in der zentralen Region des Dystrophingens. Nur wenige Patienten besitzen Duplikationen (Koenig *et al.*,1989; Matsuo,2002). Die übrigen Mutationen sind gleichmäßig über das gesamte Gen verteilt. Dabei handelt es sich um 18% Nonsense-Mutationen, 8% kleine Deletionen oder Insertionen, 7% Mutationen einer Spleißstelle und 2% Missense-Mutationen. Bei Deletionen und Duplikationen kommt es häufig zur Verschiebung des Leserasters, wodurch ein vorzeitiger Stopp der Translation verursacht wird (Roberts *et al.*,1994). Dies hat zur Folge, dass das Dystrophinprotein verkürzt synthetisiert wird und nicht mehr funktionell ist. Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der niedrigen mRNA- und Proteinstabilität bei Mutanten nur eine geringe Menge an Protein vorliegt. Jedoch weisen einige dieser Patienten wenige Fasern auf, welche Dystrophin-positiv sind. Diese revertanten Fasern findet man in etwa 50% der Patienten mit DMD. Dabei kann es sich um 0,2 - 4% der Gesamtzahl der Fasern handeln. Die Ursache für das Vorkommen dieser revertanten Fasern liegt in natürlichen, alternativen Spleißvorgängen und hängt von der Art der Mutation des jeweiligen Patienten ab (Burrow *et al.*,1991; Nicholson *et al.*,1993).

### 1.1.2 Gegenüberstellung der Becker und Duchenne Muskeldystrophie

Eine mildere Form der Muskeldystrophie stellt die Becker Muskeldystrophie (BMD; OMIM 300376) dar (Becker,1955). Die BMD weist zwar sehr ähnliche klinische Symptome auf wie die DMD, jedoch treten diese erst sehr viel später auf, sodass einige BMD Patienten bis ins hohe Alter gehfähig bleiben (England *et al.*,1990).

Bei der BMD wird entweder weniger Dystrophin gebildet oder das Dystrophinprotein liegt in veränderter Größe vor. Im Gegensatz zur Duchenne Muskeldystrophie bleibt bei Becker Muskeldystrophie-Patienten das Leseraster unverändert. Hier beschränken sich die relativ kleinen Genverluste auf Bereiche, welche zu einem nicht essentiellen Teil des Moleküls, der Rod-Domäne, gehören. Je nach Größe und Position der Deletion kann das daraus entstandene Dystrophin einen unterschiedlichen Grad an Funktionalität besitzen. Dies zeigt sich auch in dem großen Spektrum des klinischen Schweregrades der Erkrankung bei BMD Patienten (Scheuerbrandt, 1998).

Obwohl der genetische Defekt der DMD und BMD bereits seit 1987 bekannt ist, fehlt es immer noch an wirksamen Behandlungsmethoden, die nicht nur symptomatisch zu einer Verbesserung führen, sondern den Verlust der Muskelfunktion verhindern (Emery, 1993).

Daher war es Ziel dieser Arbeit, zur Entwicklung von Ansätzen für molekulare Therapien der DMD beizutragen.

Informationen zur bisherigen Standardbehandlung der DMD sind im TREAT-NMD Network zusammengetragen und einzusehen (<http://www.treat-nmd.eu/patients/DMD/dmd-care/>).

## 1.2 Molekulare Grundlagen der Duchenne Muskeldystrophie

Um die verschiedenen Ansatzmöglichkeiten für eine molekulare Therapie der Duchenne Muskeldystrophie aufzuzeigen, sollen im Folgenden die molekularen Zusammenhänge des Dystrophins in der Skelettmuskelfaser dargestellt werden.

### 1.2.1 Dystrophin

Die Duchenne Muskeldystrophie (DMD) wird durch Mutationen im Dystrophingen hervorgerufen. Dieses Gen ist das größte Gen im menschlichen Genom. Es umfasst 2,4 MB und besitzt 79 Exons (Hoffman *et al.*,2001).

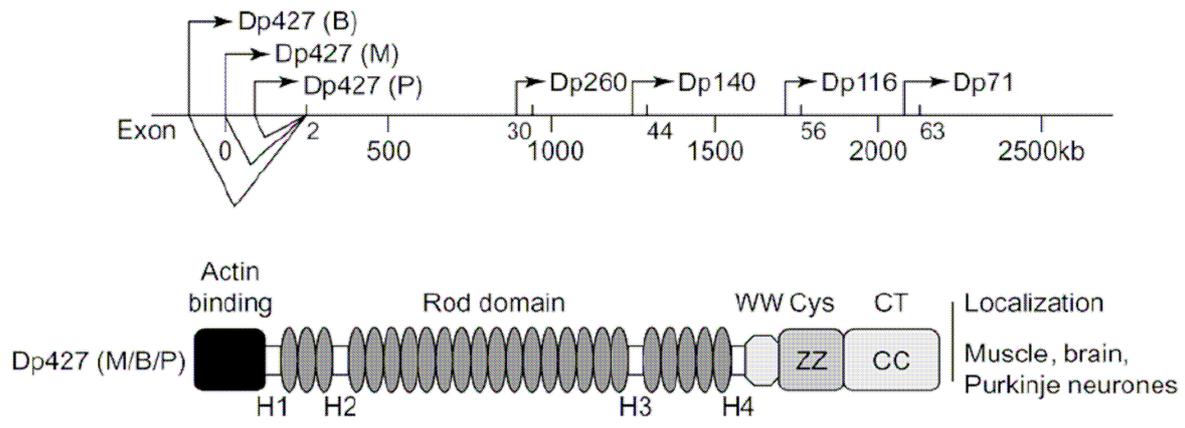
Aufgrund der Rolle als Verbindung zwischen Zytoskelett und extrazellulärer Matrix (ECM) trägt Dystrophin entscheidend zur Stabilisierung des Sarkolemma und zur Erhaltung der Muskelfaserintegrität während der Muskelkontraktion bei (Weller *et al.*,1990; Petrof *et al.*,1993; Pasternak *et al.*,1995). Der N-Terminus des Dystrophin bindet an F-Aktin, während der C-Terminus mit dem Dystrophin-assoziierten Proteinkomplex (DAPC) am Sarkolemma (Abb. 2) (Blake *et al.*,2002) verküpft ist.

Darüber hinaus ist Dystrophin auch an der Regulation der intrazellulären Signaltransduktion und der Kalziumhomöostase beteiligt (Blake *et al.*,2002). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Dystrophin eine Rolle bei der Kraft- und Signalübertragung und bei der Aggregation von Neurotransmitterrezeptoren einnimmt. Im normalen Muskel assoziiert die neuronale Stickstoffmonoxid Synthase (nNOS) mit Syntrophin im DAPC. Jedoch ist bei DMD Patienten die nNOS nicht im Sarkolemma des Skelettmuskels verankert (Brennan *et al.*,1995). Acharyya *et al.* zeigten, dass Dystrophin selbst, eventuell über den PI3K/Akt Signalweg, dazu fähig ist, Signale zu vermitteln, welche bei der Muskelatrophie und -hypertrophie von Bedeutung sind (Acharyya *et al.*,2005). So wird vermutet, dass Dystrophin Einfluss nimmt auf AKT1, welches seinerseits durch die Phosphorylierung des FOXO Transkriptionsfaktors die Hochregulierung der E3-Ligasen MAFbx und MuRF1 inhibiert. Eine transkriptionelle Hochregulierung der E3-Ligasen MAFbx und MuRF1 wurde unter atrophischen Bedingungen beobachtet (Sandri *et al.*,2004; Stitt *et al.*,2004).

Die häufigste Dystrophinisiform ist Dp71 (71 kDa), welche auch in vielen anderen Geweben nicht nur im Muskel vorkommt. Dazu gehören unter anderem Gehirn, Lunge, Leber und Nieren. Trotzdem kann Dp71 das Vollängen-Dystrophin nicht in seiner Funktion im Skelettmuskel ersetzen (Cox *et al.*,1994). Die verschiedenen Isoformen entstehen durch

alternatives Spleißen der mRNA am 3'-Ende, wodurch die Bindung der Dystrophin-assoziierten Proteine reguliert wird (Crawford *et al.*,2000).

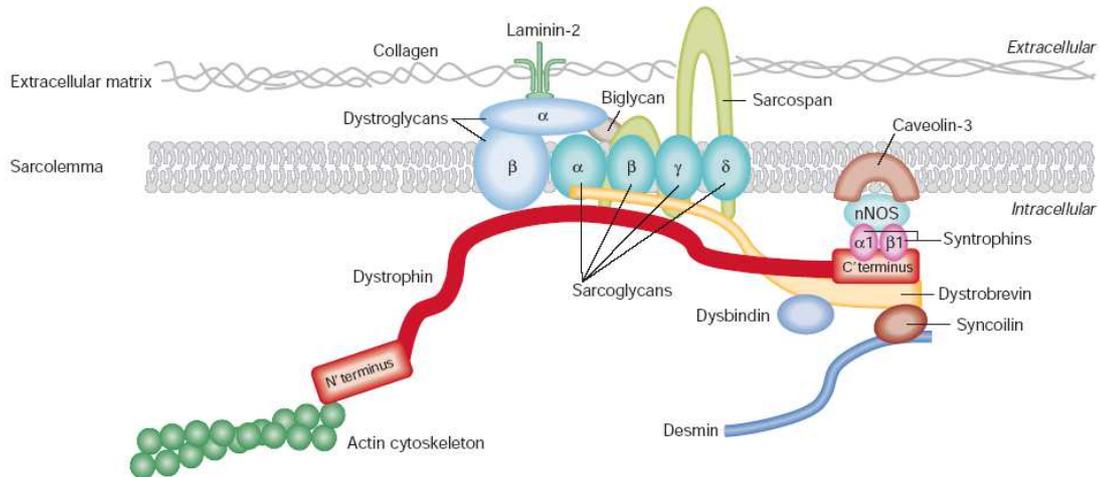
Der Anteil an Dystrophin im Skelettmuskel beträgt bis zu etwa 0,002 % des Gesamtproteingehalts. Das stabförmige Protein besteht aus 3685 Aminosäuren, welche in vier verschiedenen funktionellen Domänen organisiert sind (Abb. 1). Die N-terminale Aktin-Bindungsdomäne, die große Stab-Domäne, die Cystein-reiche Domäne und die COOH-terminale Domäne. Die N-terminale Domäne besitzt eine Aktin-Bindungsstelle (Aminosäuren 1-220). Die dazugehörige Kristallstruktur wurde bereits aufgeklärt (Norwood *et al.*,2000) und ist homolog zur Struktur von  $\alpha$ -Aktinin and  $\beta$ -Spektrin. Die Stab-Domäne (Aminosäuren 338-3055) besteht aus 24 dreifach helikalen Wiederholungen vom Spektrin-Typ, welche den Großteil des Proteins ausmachen und für die Stabform verantwortlich sind (Koenig *et al.*,1988). Man geht davon aus, dass die Stab-Domäne als Abstandhalter zu den anderen Domänen fungiert. Zusätzlich befinden sich in diesem Bereich zum einen vier kleine Prolin-reiche Scharnierregionen, die eine gewisse Flexibilität verleihen, und zum anderen eine zweite Aktin-Bindungsstelle (Koenig *et al.*,1990; Rybakova *et al.*,1996). Entscheidend für den korrekten Zusammenbau des DAPC ist die Cystein-reiche Domäne (Aminosäuren 3056-3354). Diese Domäne besitzt einige Proteinbindungsmotive und regulatorische Motive. Dazu gehört die WW-Domäne, welche an die Prolin-reichen Substrate bindet (Bork *et al.*,1994). Des Weiteren zählen dazu die zwei EF-Hand-Motive, die denen in  $\alpha$ -Aktinin ähneln und möglicherweise intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  binden. Das dritte Motiv stellt das ZZ-Motiv dar, das einem Zinkfinger-Motiv ähnelt und Calmodulin  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig bindet (Ponting *et al.*,1996). Die vierte Domäne des Dystrophinmoleküls ist der COOH-terminale Bereich (Aminosäuren 3355-3685). Dieser Bereich beinhaltet zwei  $\alpha$ -helikale coiled coil Domänen (Sadoulet-Puccio *et al.*,1997) und einen Bereich, der in Geweben, wie z.B. Gehirn und Herzmuskel, alternativ gespleißt wird.



**Abb. 1: Lage des Dystrophinpromoters und Aufbau der funktionellen Domänen.** Drei Promotoren Gehirn (B), Muskel (M) und Purkinje Neurone (P) steuern die Expression des Volllängen-Dystrophins. Verkürzte Dystrophingenprodukte werden von vier zusätzlichen internen Promotoren (Dp260, Dp140, Dp116, Dp71) gesteuert. Die Rod-Domäne besteht aus 24 dreifach Helix-Einheiten und vier Scharnierregionen (H). Dystrophin besitzt eine Anzahl von Proteindomänen, welche Bindungsstellen für Komponenten des Dystrophin-assoziierten Proteinkomplexes darstellen. Dabei handelt es sich um die WW-Domäne (WW), die ZZ-Domäne (ZZ) in der Cystein-reichen Region und die coiled-coil Domäne am COOH-Terminus (CT) (basierend auf Blake *et al.*, 2000).

### 1.2.2 Der Dystrophin-assoziierte Proteinkomplex (DAPC)

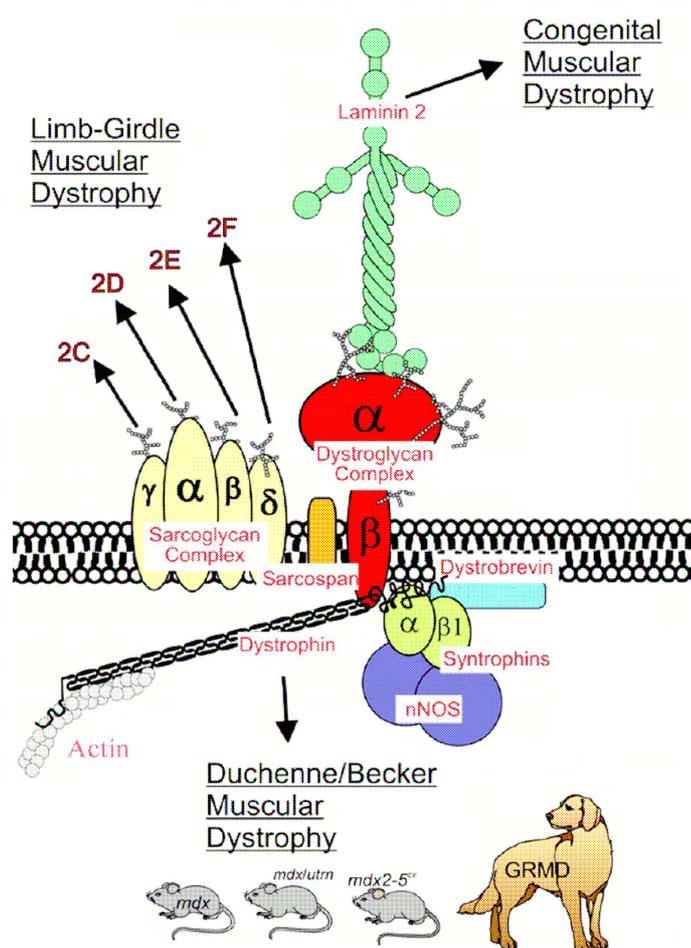
Im Skelettmuskel befindet sich Dystrophin auf der zytoplasmatischen Seite des Sarkolemma. Dystrophin bindet einen Komplex aus Dystrophin-assoziierten Proteinen (DAPC), welcher sich über das Sarkolemma erstreckt. Dystrophin und der DAPC stellen eine Brücke zwischen der extrazellulären Matrix, dem Aktin-basierten Zytoskelett und den Intermediärfilamenten her (Abb. 2).



**Abb. 2: Anordnung der Komponenten des Dystrophin-assoziierten Proteinkomplexes (DAPC) am Sarkolemma des Skelettmuskels.** Der Dystrophin-assoziierte Proteinkomplex im Muskel verbindet das innere Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix (Nowak *et al.*, 2004).

Der DAPC wird durch den Verlust von Dystrophin destabilisiert (Straub *et al.*, 1997b). Fehlt Dystrophin, dann ist zwar die Expression auf mRNA Ebene der DAPC-Komponenten normal, jedoch kann sich der Komplex nicht richtig zusammenbauen und/oder in das Sarkolemma integrieren oder wird abgebaut. Dies wiederum führt zu einer fortschreitenden Schädigung der Fasern und einer erhöhten Membrandurchlässigkeit. Zudem besitzt der DAPC eine Rolle in der Signalweiterleitung. Kann diese Funktion durch den DAPC nicht mehr erfüllt werden, trägt dies ebenfalls zur Pathogenese bei (Blake *et al.*, 2002). Ein verkürztes Dystrophin, welches die Cystein-reiche Domäne besitzt, aber nicht die N-terminale Aktin-Bindungsstelle, lässt den Zusammenbau des DAPC zu. Jedoch ist die Wiederherstellung des DAPC über dieses mutierte Dystrophin nicht ausreichend, um den DMD Phänotyp zu verhindern (Cox *et al.*, 1994). Dies zeigt, dass die Interaktion mit dem DAPC und die Verknüpfung mit dem Aktin-Zytoskelett über die Aktin-Bindungsstelle unentbehrlich sind für die Funktion des Dystrophinmoleküls.

Der DAPC setzt sich aus drei einzelnen Unterkomplexen basierend auf deren Lage innerhalb der Zelle sowie deren physischen Verbindung miteinander (Abb. 2) zusammen: der Dystroglykankomplex, der Sarkoglykankomplex und der zytoplasmatische Komplex (Blake *et al.*, 2002). Mutationen innerhalb, einer dieser Komponenten führen zu autosomal vererbten Muskeldystrophien (Dalkilic *et al.*, 2003) (Abb. 3). Darüber hinaus steht der DAPC mit einigen extra- und intrazellulären Proteinen in Kontakt wie z.B. nNOS (Brenman *et al.*, 1995) und Laminin-2 (Henry *et al.*, 1996).



**Abb. 3:** Durch Mutationen in verschiedenen Bereichen des Komplexes verursachte Muskeldystrophien sind in obiger Abbildung dargestellt. Tiermodelle für die Gentherapie der Duchenne Muskeldystrophie sind ebenfalls gezeigt (angepasst aus Allamand *et al.*, 2000).

Die zwei wichtigsten Komponenten des Dystroglykankomplexes sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -Dystroglykan (Abb. 2 und 3). Beide werden von einem einzigen Dystroglykang kodiert und in mRNA transkribiert. Anschließend wird das Vorläuferprotein proteolytisch prozessiert (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992).  $\alpha$ -Dystroglykan befindet sich auf der extrazellulären Seite des Sarkolemma und liegt glykosyliert vor, wodurch die Molekülmasse zwischen 120 und 180 kDa, abhängig vom Grad der Glykosylierung, variieren kann. Die  $\beta$ -Dystroglykan Untereinheit ist ein 43 kDa großes Transmembranprotein mit einer einzigen Membrandurchspannenden Region. Im Skelettmuskel bindet  $\beta$ -Dystroglykan intrazellulär über seinen C-Terminus die  $\beta$ -Spektrin/ $\alpha$ -Aktinin-Repeats des Dystrophin (Huang *et al.*, 2000). Die Kristallstruktur des  $\beta$ -Dystroglykan/Dystrophin-Komplex zeigte, dass  $\beta$ -Dystroglykan mit der WW-Domäne und den EF-Hand-Motiven des Dystrophins in Wechselwirkung tritt. In anderen Geweben bindet  $\alpha$ -Dystroglykan alternative Proteine, darunter Dystrophinisoformen,

wie Dp260, Dp140, Dp116 und Dp71 (Jung *et al.*,1995; Finn *et al.*,1998a; Finn *et al.*,1998b; Saito *et al.*,1999), oder Utrophin, das ein autosomal-kodiertes Paralog des Dystrophin darstellt (Matsumura *et al.*,1992; Chung *et al.*,1999). Auf der extrazellulären Seite interagiert  $\beta$ -Dystroglykan nicht-kovalent mit  $\alpha$ -Dystroglykan (Sciandra *et al.*,2001).  $\alpha$ -Dystroglykan seinerseits bindet extrazelluläre Proteine wie Laminin-1 und -2, Agrin, Biglykan, Perlecan und Neurexine (Sugiyama *et al.*,1994; Talts *et al.*,1999; Sugita *et al.*,2001). Dystroglykan und andere DAPC Proteine werden nicht nur im Muskel gebildet, sondern auch im Zentralnervensystem (Blake *et al.*,2000; Cohn,2005). Entsprechend zeigt sich bei Muskeldystrophien häufig ein weites Spektrum an ZNS-Schäden (Anderson *et al.*,2002). Des Weiteren binden andere Proteine an den C-Terminus von  $\beta$ -Dystroglykan. Dazu zählen Signalmoleküle wie Grb2, Bestandteile der ERK-MAP Kinasekaskade und Rapsyn. Rapsyn ist ein postsynaptisches Protein, welches an der Zusammenlagerung der Acetylcholinrezeptoruntereinheiten beteiligt ist, wobei die Rapsynexpression bevorzugt an der neuromuskulären Endplatte erfolgt (Yang *et al.*,1995; Cartaud *et al.*,1998; Spence *et al.*,2004). Somit kann  $\beta$ -Dystroglykan auch eine Rolle bei der Signalübermittlung zugesprochen werden.

Der Sarkoglykankomplex besteht aus den fünf Transmembranproteinen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Sarkoglykan und Sarcospan (Abb. 2 und 3). Viele autosomal-rezessiv vererbte Gliedergürteldystrophien werden durch Mutationen der Sarkoglykane verursacht (Straub *et al.*,1997b; Ozawa *et al.*,1998).

Die dritte Komponente des DAPC, der zytoplasmatische Komplex, setzt sich unter anderem aus Syntrophinen und den Dystrobrevinen zusammen (Abb. 2 und 3). Zur Familie der Syntrophine zählen die Proteine  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$  and  $\gamma 2$  (Piluso *et al.*,2000). Diese weisen ein unterschiedliches Expressionsmuster in den verschiedenen Muskeln auf, besitzen aber alle ähnliche funktionelle Domänen. PH-Domänen vom Pleckstrin-Typ, eine Syntrophin unique region und eine PDZ-Domäne. Die PDZ-Domäne tritt in Wechselwirkung mit einigen anderen Proteinen, wie z. B. ErbB4, Na<sup>2+</sup>-Kanälen und nNOS (Brenman *et al.*,1995; Blake *et al.*,2000). Dystrobrevine weisen deutliche Sequenzhomologien zu dem COOH-Terminus von Dystrophin auf (Wagner *et al.*,1993; Roberts,2001). Zwei unabhängige Dystrobrevingene kodieren für mehrere Isoformen (Peters *et al.*,1997b; Sadoulet-Puccio *et al.*,1997).  $\alpha$ -Dystrobrevine werden in den Muskeln und im Zentralnervensystem exprimiert, während  $\beta$ -Dystrobrevin im Muskel nicht vorkommt, jedoch im Gehirn und anderen Geweben, wie Plazenta und Niere, zu finden ist. Die genaue Funktion von  $\alpha$ -Dystrobrevinen im

Skelettmuskel ist noch unbekannt, aber man vermutet, dass sie eine Rolle bei der intrazellulären Signalübertragung besitzen.

### 1.2.3 Utrophin

Utrophin weist einen hohen Grad an Ähnlichkeit zu Dystrophin auf, besonders bezüglich funktionell wichtigen Proteindomänen (Tinsley *et al.*,1992; Pearce *et al.*,1993) und Bindepartnern im Muskel (Matsumura *et al.*,1992). Das Utrophinogen konnte im Menschen auf dem Chromosom 6q24 lokalisiert werden (Love *et al.*,1989; Buckle *et al.*,1990). Das Mausäquivalent liegt auf der proximalen Region des Chromosoms 10 (Tinsley *et al.*,1992). Anfängliche Untersuchungen der Sequenz und der Proteinstruktur von Utrophin legten eine deutliche Ähnlichkeit mit Dystrophin offen (Tinsley *et al.*,1992). Die N-terminale Domäne von Utrophin, einschließlich der ersten 250 Aminosäuren, bindet F-Aktin mit einer ähnlichen Affinität wie Dystrophin, obwohl dieser Prozess über  $Ca^{2+}$ /Calmodulin reguliert ist (Winder *et al.*,1995a; Winder *et al.*,1995b; Winder *et al.*,1995c; Morris *et al.*,1999). Neben der Cystein-reichen und C-terminalen Domäne ist diese Region zu 80% identisch mit der äquivalenten Domäne von Dystrophin (Tinsley *et al.*,1992). Daher wird erwartet, dass Utrophin und Dystrophin auch gemeinsame C-terminale Proteinbindepartner besitzen (James *et al.*,1995), wie den Dystrophin-assoziierten Proteinkomplex (DAPC), einschließlich der Dystroglykane (James *et al.*,1996) und Syntrophine (Peters *et al.*,1997a). Die Stabdomäne, sowohl des Utrophins als auch des Dystrophins, besteht aus einer Zahl von Spektrin-ähnlichen Wiederholungen mit Prolin-reichen Scharnierregionen (Tinsley *et al.*,1992) und stellt die am wenigsten konservierte Region zwischen den beiden Proteinen dar (Pearce *et al.*,1993). Das Utrophinprotein ist ubiquitär exprimiert (Khurana *et al.*,1991; Love *et al.*,1991; Nguyen *et al.*,1991; Khurana *et al.*,1992; Nguyen *et al.*,1992; Blake *et al.*,1996). Im Muskel wird Utrophin in intramuskulären Nerven, Blutgefäßen und Muskelfasern exprimiert. Innerhalb der erwachsenen Muskelfaser ist Utrophin hauptsächlich im Acetylcholinrezeptor (ACHR)-reichen Bereich an der neuromuskulären Endplatte (NMJ) lokalisiert. Dort bindet es an die Komponenten des DAPC (Khurana *et al.*,1991; Ohlendieck *et al.*,1991; Matsumura *et al.*,1992; Nguyen *et al.*,1992; Campanelli *et al.*,1994) und der myotendinous junction (MTJ) (Khurana *et al.*,1991), wobei Dystrophin am Sarkolemma vorherrscht. Es wird vermutet, dass Utrophin eine wichtige Rolle für die Struktur des post-synaptischen Zytoskeletts spielt (Love *et al.*,1993). Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Domänen wird Utrophin als autosomale, fötale Form des Dystrophin gesehen. Utrophin kommt im hohen Maße im sich entwickelnden fötalen Muskel und in Satellitenzellen vor. Utrophin ist am Sarkolemma im fötalen Muskel

lokalisiert, verschwindet im weiteren Verlauf von dort und wird postnatal durch Dystrophin ersetzt (Clerk *et al.*,1993). Es wird vermutet, dass Dystrophin möglicherweise stärker spezialisiert und angepasst ist an die enorme Belastung des Skelett- und Herzmuskels während der Geburt. Bis zu diesem Zeitpunkt bewirkt Utrophin möglicherweise in den sich entwickelnden Myotuben eine Art struktureller Stabilität (Tinsley *et al.*,1996). Trotz der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit sind beide Proteine unterschiedlich im normalen adulten Gewebe lokalisiert und werden scheinbar reziprok exprimiert, wodurch man auf eine aufeinander abgestimmte Regulation schließen kann. Im vollentwickelten Muskel finden sich beide in den neuromuskulären Endplatten (NMJ), obgleich mit unterschiedlicher Lokalisation innerhalb der neuromuskulären Endplatte. Beide kommen in unterschiedlichem Muster in Gefäßmuskeln (Rivier *et al.*,1997) und in Herzmuskelzellen vor (Pons *et al.*,1994). Utrophin kann möglicherweise funktionell für eine Dystrophindefizienz kompensieren. In bestimmten Myopathien (einschließlich DMD) findet man Utrophin neu an das Sarkolemma lokalisiert, was oft mit einer signifikanten Erhöhung der Utrophinmenge verbunden ist. Zusätzlich wird Utrophin während Perioden, in denen keine Nekrose in Dystrophin-defizienten Muskeln stattfindet, hochreguliert (Khurana *et al.*,1991; Clerk *et al.*,1993; Karpati *et al.*,1993).

In *mdx*-Mäusen wird eine einsetzende Muskelnekrose erst dann beobachtet, wenn die hohe perinatale Menge an Utrophin auf ein Niveau sinkt, das dem Niveau im adulten Muskel entspricht. Somit lässt dies darauf schließen, dass Utrophin eine Schutzfunktion in Abwesenheit von Dystrophin innehat (Khurana *et al.*,1991). Dieser verzögerte Beginn von DMD entspricht den Beobachtungen, in denen hohe Mengen an fötalem Hämoglobin (HbF) bei der Geburt über eine begrenzte Zeit postnatal defektes adultes Hb bei einer  $\beta$ -Thalassaemia kompensieren können. Dadurch wird der Ausbruch der Symptome verzögert, solange bis der fötale Spiegel unterhalb der noch kompensierenden Menge abgesunken ist (Vrettou *et al.*,2000). Der milde Phänotyp in der *mdx*-Maus und in Utrophin<sup>-/-</sup>-Mäusen (Deconinck *et al.*,1997a) entsteht wahrscheinlich durch die funktionelle Redundanz, welche jeweils für die Abwesenheit des anderen Paralogs kompensiert. Diese Aussage bestärkend zeigen Utrophin<sup>-/-</sup>-*dys*<sup>-/-</sup> (dko) Mäuse einen sehr schwerwiegenden myopathischen Phänotyp, der innerhalb weniger Wochen nach der Geburt zum Tode führt. Diese Mäuse weisen viele Anzeichen auf, welche typisch für DMD im Menschen sind, wie fortschreitende Muskelschwäche, Knochenbrüche und Kyphoskoliose (Deconinck *et al.*,1997a; Grady *et al.*,1997).

### 1.3 Therapieforschung und -entwicklung

#### 1.3.1 Tiermodelle für DMD

In der Therapieforschung und -entwicklung spielen Tiermodelle eine große Rolle. Zur Duchenne Muskeldystrophie existieren sowohl Säugetier-Tiermodelle (murine, kanine und feline), als auch andere Tiermodelle, wie z. B. der Zebrafisch und der Fadenwurm *C. elegans*. Im nächsten Abschnitt sollen kurz die wichtigsten Daten zu diesen Tiermodellen zusammengetragen werden, da auch die vorliegende Arbeit auf Experimenten in zwei dieser Tiermodelle, zum einen dem *mdx*-Mausmodell und zum anderen dem *C. elegans* Modell, beruht.

##### 1.3.1.1 *mdx*-Maus

Die C57Bl/10ScSn *mdx*-Maus (murine dystrophy x-linked) (Bulfield *et al.*,1984) stellt das geläufigste und am häufigsten verwendete murine Modell für DMD dar. Dieses Mausmodell besitzt eine Punktmutation (CAA → TAA) im Dystrophingen an der Position 3185, wodurch ein frühzeitiges Stop-Codon entsteht (Sicinski *et al.*,1989). Damit kann kein funktionelles Dystrophin gebildet werden, abgesehen von einer kleinen Anzahl revertanter Fasern (etwa 1%) (Gillis,1999). Die Maus weist eine Kyphose im Alter, eine geringere Kapazität Muskelgewebe zu regenerieren und kardiomyopatische Auffälligkeiten im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen auf (McIntosh *et al.*,1998a; McIntosh *et al.*,1998b). Der Phänotyp der Erkrankung ist jedoch in der *mdx*-Maus schwächer ausgeprägt als im Menschen (Gillis,1999), es sei denn, man unterzieht die Maus körperlichen Anstrengungen (Nakamura *et al.*,2001) oder erhöht *ex vivo* oder *in vivo* die mechanische Belastung (Danialou *et al.*,2001; Kamogawa *et al.*,2001). Bei der *mdx*-Maus beobachtet man nur eine geringe Abnahme der Lebensspanne, wo hingegen DMD Patienten an sehr stark progressivem Muskelschwund leiden und innerhalb des dritten oder vierten Lebensjahrzehnts versterben. Es lassen sich zwei Vermutungen anstellen, die sich nicht unbedingt gegenseitig ausschließen müssen. Zum einen, wirken möglicherweise andere Proteine, wie Utrophin, kompensierend auf das Fehlen von Dystrophin in der Maus, jedoch nicht im Menschen. Zum anderen, unterliegt die Maus im Käfig nicht denselben Stressfaktoren wie der Mensch. Hier zeigen sich die Schwierigkeiten beim Übergang von der rein genomischen Beschreibung einer Krankheit zum Verständnis des funktionellen Phänotyps in verschiedenen Organismen. Der milde Phänotyp der *mdx*-Maus führt dazu, dass es schwieriger ist, den Erfolg eines therapeutischen Eingriffes nachzuweisen. Hierin zeigt sich die Notwendigkeit von Methoden, die es ermöglichen Veränderungen dieses

milderen Phänotyps der Maus im biologischen Kontext eines veränderten Proteoms und Metaboloms zu erkennen. Darüber hinaus lassen sich in der Maus gefundene Erkenntnisse auf den Menschen nur eingeschränkt übertragen.

Einige Merkmale der DMD kann man jedoch auch in der Maus wiederfinden. Die Kreatinkinaseaktivität im Serum ist beispielsweise stark erhöht. Der Nekrose-Regeneration-Zyklus der Muskelfasern beginnt mit 15-21 Tagen und hält bei diesen Tieren bis zu einem Alter von mehr als 2 Jahren an. Der Höhepunkt liegt zwischen 45 und 60 Tagen. Zudem lässt sich eine deutliche Entzündungsreaktion beobachten, wobei Immunzellen in den Muskel einwandern. In der Regel sind einige Muskeln stärker betroffen als andere, vor allem das Diaphragma ist stark beeinträchtigt. Darauf weisen histopathologische Befunde und der Verlust an Muskelkraft im Diaphragma hin. Ein charakteristisches Merkmal sich regenerierender Muskeln ist das Auftreten zentral lokalisierter Zellkerne. Unter normalen Bedingungen kehren die Zellkerne wieder in den Randbereich der Muskelfaser zurück, wenn der Regenerationsprozess beendet ist. Im *mdx*-Muskel jedoch bleibt ein hoher Anteil an zentral lokalisierten bzw. internalisierten Zellkernen während der gesamten Lebensdauer bestehen. Es ist nicht bekannt, warum in der *mdx*-Maus die Zellkerne zentral in der Faser verbleiben (Karpati *et al.*,1988; Louboutin *et al.*,1993; Briguet *et al.*,2004; Turk *et al.*,2005).

#### 1.3.1.2 Kanine und feline Modelle für DMD

Eine spontane Mutation des Dystrophingens führte zu einer X-linked Muskeldystrophie und wurde in einigen Züchtungen der Haushunde Golden Retriever (Cooper *et al.*,1988), dem Rottweiler (B. Cooper in Patridge,1997) und dem Deutsch Kurzhaar (Schatzberg *et al.*,1999) identifiziert. Der dystrophe Golden Retriever (GRMD) ist am intensivsten untersucht und am besten charakterisiert worden. Im Golden Retriever führt bereits ein einzelner Basenaustausch in der Spleißstelle des Introns 6 zur Erkrankung. Dabei kommt es zum Skipping von Exon 7 und zur Veränderung des Leserasters im Exon 8, wodurch ein vorzeitiger Stopp entsteht (Sharp *et al.*,1992). Im Gegensatz zur Dystrophin-defizienten *mdx*-Maus leidet der GRMD Hund unter einem schnell fortschreitenden, schwerwiegenden Krankheitsbild ähnlich dem zur humanen DMD. Allerdings besteht eine große Schwankungsbreite, was die Schwere der Erkrankung angeht. So können drei Phänotypen mit unterschiedlichem Schweregrad unterschieden werden. Die Existenz dieser verschiedenen Phänotypen muss in die Betrachtung der Ergebnisse aus präklinischen Studien mit einbezogen werden, da unterschiedliche Antworten auf die Medikamentengabe oder andere Behandlungen zu erwarten sind (Ambrosio *et al.*,2009). Einige der Welpen überleben nur wenige Tage,

während andere monate- oder sogar jahrelang gehfähig bleiben (Ambrosio *et al.*,2008). Im Alter von 6-9 Wochen zeigen sich Gangabnormalitäten und fortschreitende Schwäche aufgrund nicht vollständiger Regeneration des Muskels im GRMD. Mit etwa 6 Monaten entwickelt sich bereits eine starke Fibrose und es kommt zu Knochenbrüchen, z.B. des Tarsus (Valentine *et al.*,1988; Kornegay *et al.*,2003). Das Wachstum der erkrankten Tiere ist verzögert und die Gehfähigkeit eingeschränkt (Valentine *et al.*,1988). Stark betroffene Hunde haben Schwierigkeiten, sich aufzurichten und können nur wenige Schritte gehen. Im Alter von 12 Monaten beginnen sich pharyngeale und ösophageale Funktionsstörungen zu entwickeln und die respiratorische Kapazität nimmt ab. Eine Kyphose entwickelt sich im Alter von 6 Monaten. Eine myokardiale Beteiligung zeigt sich deutlicher im Golden Retriever als in anderen Tiermodellen. Die kardialen Komplikationen im Hund sind ähnlich zu denen im DMD Patienten (Valentine *et al.*,1988; Moise *et al.*,1991).

Der GRMD Hund weist Veränderungen im Muskel auf, die der Pathogenese im Menschen besser entsprechen als es in der *mdx*-Maus der Fall ist (Cooper *et al.*,1988). Darüber hinaus besitzen erwachsene Hunde ein zum DMD Patienten vergleichbares Körpergewicht (Howell *et al.*,1997). Deshalb und da es sonst kein Großtiermodell für DMD bisher gab, wurde das GRMD Tiermodell in den letzten Jahren favorisiert. Jedoch handelt es sich beim Hund nicht um das ideale Labortier, da die Haltung sehr kostenintensiv, die Spezies genetisch nicht manipulierbar und sehr emotional ist. Kanine Modelle können aus praktischen Gründen sehr wahrscheinlich das *mdx*-Modell in Hochdurchsatzstudien nicht ablösen. Trotzdem kann das kanine Modell dazu eingesetzt werden, um Technologien, welche in der Maus entwickelt wurden, auf ihre Anwendbarkeit in Tieren, die in ihrer Größe und ihrer Pathologie der Erkrankung dem DMD Patienten stärker ähneln, zu beurteilen. Positive Ergebnisse von Gentransferexperimenten im GRMD-Hund führten zur Einführung ähnlicher klinischer Studien im Menschen (Thioudellet *et al.*,2002).

Neben den GRMD existiert noch ein weiteres kanines Modell, CXMDJ, welches jedoch nicht sehr weit verbreitet ist und hier deshalb nur erwähnt werden soll. Beagle wurden mit betroffenen Golden Retriever Hunden verkreuzt, um eine kleinwüchsiger Rasse zu erhalten. Eine dieser Linien wurde in Japan etabliert (Shimatsu *et al.*,2003). Der Vollständigkeit halber soll hier noch auf weitere Hunde-Modelle für die Duchenne Muskeldystrophie verwiesen werden, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen wird (Walmsley *et al.*,2010; Smith *et al.*,2011).

Darüber hinaus wurde unter den mammalen Modellen auch die dystrophe Katze beschrieben, das “hypertrophe feline muscular dystrophy” (HFMD) (Winand *et al.*,1994). Aber auch dieses

Tiermodell kommt kaum zum Einsatz, weshalb hier nicht weiter darauf eingegangen werden soll.

### 1.3.1.3 Weitere Tiermodelle

Die komplexe Pathologie der Duchenne Muskeldystrophie kann nur im Säugetiermodell korrekt wiedergegeben werden, welches sich jedoch nicht so leicht für Hochdurchsatz-Studien einsetzen lässt. Darüber hinaus erschweren die Komplexität und die individuellen Schwankungen die Reproduzierbarkeit der Experimente.

Weitere Tiermodelle wie der Zebrafisch *Danio rerio* (Chambers *et al.*,2001; Rubinstein,2003) und der Nematode *C. elegans* (Baumeister *et al.*,2002) weichen von Säugetiermodellen dahingegen ab, dass sie eine andere Muskulatur und Pathologie der Erkrankung im Vergleich zum menschlichen Patienten besitzen. Vorteile der Nicht-Mammalia-Modelle sind zum einen, dass man leicht eine große Anzahl an Tieren halten kann und zum anderen, dass die Tiere genetisch einfach zu manipulieren sind. Besonders im Falle von *C. elegans* besteht eine enorme physiologische Einfachheit.

#### **Zebrafisch**

Zebrafische sind deshalb ein attraktives Modell für Myopathie, da sie einen hohen Anteil an Skelettmuskel haben und da sie Orthologe der meisten humanen DAPC Proteine mit einer ähnlichen Membranlokalisierung aufweisen (Chambers *et al.*,2001; Guyon *et al.*,2003). Der Einsatz von Oligonukleotidanalogen (Morpholinos), welche die Translation spezifischer mRNA-Transkripte unterbrechen, ermöglichte die Erzeugung eines Dystrophin-defizienten Zebrafisches. Dieser besitzt einen instabilen DAPC, eine gekrümmte Morphologie und zeigt eine geringere motorische Aktivität (Guyon *et al.*,2003).

#### ***C. elegans***

Dystrophine wurden in einigen Invertebraten einschließlich *C. elegans* (Bessou *et al.*,1998; Chamberlain *et al.*,2000), *Drosophila* (Neuman *et al.*,2001) und dem Seeigel (Neuman *et al.*,2001) identifiziert. Der *C. elegans* Wurm bewegt sich durch die Kontraktion longitudinaler, gestreifter Muskeln, die ein Dystrophinhomolog namens *dys-1* exprimieren (Bessou *et al.*,1998), fort. Das Dystrophinhomolog interagiert mit anderen DAPC Proteinen (Gieseler *et al.*,1999a; Gieseler *et al.*,1999b; Chamberlain *et al.*,2000). Mutationen des *dys-1* bewirken eine Hyperaktivität und Hyperkontraktion und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Neurotransmitter Acetylcholin und dessen Inhibitoren (Bessou *et al.*,1998). Die *C. elegans* Mutante *dys-1; hlh-1* mit einer Mutation des *dys-1* Gens in Verbindung mit

einer milden *MyoD*-Mutation entwickelt einen muskeldegenerativen, annähernd unbeweglichen Phänotyp (Gaud *et al.*,2004; Segalat,2006; Segalat,2007). Die vorliegende Arbeit basiert zum großen Teil auf Ergebnissen aus Untersuchungen in diesem Nematodenmodell.

Der herausragende Vorteil der Nematoden gegenüber anderer Tiermodelle besteht in der leichten genetischen Manipulierbarkeit. Zudem betreiben *C. elegans* Parthenogenese, wodurch die Produktion von Klonen sehr viel leichter erfolgen kann. Weiter lässt sich *C. elegans* in großen Mengen in Mikrotiter-Platten heranzüchten, wodurch sie sich sehr gut für die Durchführung von Hochdurchsatz-Studien sowohl genetischer, als auch pharmakologischer Untersuchungen eignen (Baumeister *et al.*,2002).

Tiermodelle liefern sehr wertvolle Anhaltspunkte zum Verständnis der Pathogenese der DMD. Zudem können mittels Tiermodellen therapeutische Ansätze entwickelt und überprüft werden (Allamand *et al.*,2000). Einige murine, kanine und feline Arten weisen Mutationen des Dystrophingens auf, wodurch es zum Verlust von Dystrophin kommt und sich Dystrophien mit unterschiedlichem Schweregrad entwickeln konnten.

Während eine artspezifische Antwort auf eine Dystrophindefizienz im Hinblick auf die Funktion des Proteins informativ sein kann (Cullen *et al.*,1988), ist diese artspezifische Antwort jedoch auch ein Hinweis darauf, dass Ergebnisse aus Tierstudien nur unter Vorbehalt auf die Erkrankung beim Menschen extrapoliert werden können.

### 1.3.2 Molekulare Therapie für DMD

Die Erweiterung des Wissenstandes bezüglich der Funktion von Dystrophin und dessen Rolle im Muskel führte zu einem besseren Verständnis der Pathogenese der DMD. Zusammen mit den Fortschritten in der Entwicklung neuer Methoden und Techniken in der Molekularbiologie ergeben sich viele verschiedene Behandlungsansätze. Der Gentherapie stehen Plasmide oder Viren zur Verfügung, Mutationen können mittels Chimaeraplasten oder Zinkfinger-nukleasen (Urnov *et al.*,2005) korrigiert werden, Exon Skipping kann mittels Antisense-Oligonucleotide induziert werden und ein Readthrough von Nonsense-Mutationen kann via Aminoglykosid-Antibiotika erreicht werden (Nowak *et al.*,2004). Die Inhibition des Abbaus durch das Proteasom ist in der Lage, ein verkürztes Dystrophinprotein zu stabilisieren. Darüber hinaus können andere Proteine hochreguliert werden, wodurch der dystrophe Verlauf verhindert wird (Nowak *et al.*,2004). Des Weiteren können Muskeln mit Myoblasten oder Stammzellen wiederhergestellt werden (Nowak *et al.*,2004). Diese Ansätze

sind sehr vielversprechend für die Therapie degenerativer Erkrankungen und sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

#### 1.3.2.1 Modifikation des Dystrophin mRNA-Spleißens: Exon skipping

Antisense-Oligonukleotide werden dazu benutzt, den Spleißvorgang zu manipulieren und Exon skipping zu induzieren. In diesem Ansatz werden Antisense-Oligonukleotide (AONs) eingesetzt, welche Spleißstellen oder Spleiß-Enhancer-Stellen blockieren. Antisense-Oligonukleotide hybridisieren an spezifischen Motiven, die am Spleißvorgang beteiligt sind und für die Erkennung des Exons in der prä-mRNA benötigt werden. Dadurch wird der Aufbau eines normalen Spleißapparates verhindert. Dies führt dazu, dass das Zielexon nicht mehr erkannt und somit zusammen mit den angrenzenden Introns herausgeschnitten wird. Das Dystrophingen eignet sich gut für diese Strategie, da die meisten DMD Patienten (65%) eine Verschiebung des Leserasters aufgrund einer Deletion oder Duplikation (~10%) aufweisen, was dazu führt, dass nicht-funktionelles Dystrophin gebildet wird. Deletionen des Dystrophin, welche das Leseraster erhalten, haben ein intern verkürztes, aber teilfunktionelles Dystrophin und damit einen milderen BMD Phänotyp zur Folge.

Deletionen der Exone 32–44, 48–51 oder 48–53 (Melis *et al.*,1998) und der Exone 45–55 (Beroud *et al.*,2007) führten zur Bildung von funktionellen Dystrophinmolekülen, wie sie in einigen BMD-Patienten gefunden wurden. Bei der DMD können Exons für das Exon skipping ausgewählt werden, die out-of-frame Deletionen flankieren. Somit kann das Leseraster wiederhergestellt und ein verkürztes, aber teilfunktionelles Dystrophin wieder gebildet werden. Die direkte Injektion von Antisense-Oligonukleotiden in den Muskel von *mdx*-Mäusen führte zu einer stabilen Wiederherstellung der Dystrophinexpression am Sarkolemma (McClorey *et al.*,2005; Wells,2006). Verschiedene chemische Modifikationen der Antisense-Oligonukleotide wurden in diesem Experiment eingesetzt. Dabei handelte es sich ursprünglich um 2'-*O*-Methylphosphorothioat (2OMe), Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligomere (PMOs) und Peptid-gekoppelte PMOs (PMO-Pep). Erst kürzlich führte eine systemische Verabreichung von Antisense-Oligonukleotiden (AON) in *mdx*-Mäusen zu einer nennenswerten Induzierung von Exon skipping (Alter *et al.*,2006; Fletcher *et al.*,2006; Fletcher *et al.*,2007). Eine Studie von Alter *et al.* (Alter *et al.*,2006), in der wiederholt intravenös ein PMO verabreicht wurde, führte zur Expression von Dystrophin in funktionell ausreichendem Ausmaß im Skelettmuskel des gesamten Körpers von *mdx*-Mäusen zusammen mit einer Verbesserung der Muskelfunktion.

Zu den Limitationen der Antisense-Oligonukleotide gehört das Vorhandensein verschiedener Deletionen, wodurch verschiedene Antisense-Oligonukleotide benötigt werden. Zudem ist die Behandlung nicht dauerhaft. Die Wirkung hält nur so lange an, wie Antisense-Oligonukleotide im Gewebe vorhanden sind. Darüber hinaus wird die Wirkdauer auch von der Halbwertszeit der mRNA, in der das Exon skipping stattfindet, und des resultierenden Proteins bestimmt. Die Therapie mit Antisense-Oligonukleotiden erfordert eine lebenslange wiederholte Behandlung des betroffenen Individuums. Somit kann sich die ständige Verabreichung von Antisense-Oligonukleotiden als toxisch erweisen. Jedoch befinden sich viele Deletionen in spezifischen Hot-Spots des Dystrophins. Das Skipping von sieben ausgewählten DMD Exons würde das Leseraster in etwa 70% der betroffenen Jungen wiederherstellen. Die Verabreichung von 2OMe-AON in *mdx*-Mäusen konnte die Dystrophinexpression für mindestens 8 Wochen aufrechterhalten (Lu *et al.*,2003). Die Lebensdauer der Dystrophinexpression kann auch durch den Einsatz von PMO signifikant verbessert werden. Bei der Behandlung mit PMO fällt die Expression erst nach 14 Wochen in Folge einer einzelnen intramuskulären Injektion ab (Wells *et al.*, unveröffentlichte Arbeit). Obwohl abhängig und unabhängig von der Hybridisierung Toxizitäten beobachtet wurden, besitzen Antisense-Oligonukleotide ein gutes Sicherheitsprofil, das sich aus Daten von Untersuchungen am Menschen ergeben hat (Muntoni *et al.*,2007).

Eine klinische Studie der Phase I liefert den Nachweis für die Wirksamkeit der Spleißmodulation bei der DMD. Das PMO Antisense-Oligonukleotid (AVI-4658) wurde unilateral in den *Extensor digitorum brevis* Muskel von sieben Patienten injiziert. Bei AVI-4658 handelt es sich um eine 30-mer Sequenz zum Skipping des Exon 51 (Arechavala-Gomez *et al.*,2007). Die PMO Antisense-Oligonukleotide wurden von allen Patienten gut vertragen. Fünf der sieben Patienten erhielten höhere Dosen und wiesen eine *de novo* Dystrophinexpression von bis zu 42% des normalen Niveaus in Dystrophin-positiven Fasern auf (Kinali *et al.*,2009). Die Muskeln der Patienten, welche mit der höheren Dosis behandelt wurden, zeigten klare qualitative und quantitative Veränderungen in ihrer Dystrophinexpression. Diese Veränderungen traten jedoch nicht zusammen mit Entzündungen oder einer Immunantwort gegen die Dystrophin-positiven Fasern auf (Kinali *et al.*,2009). Somit konnte auch im Menschen das Potential des Exon Skipping bei der DMD gezeigt werden.

### 1.3.2.2 Proteinersatztherapie

#### **Adeno-assoziierte virale Vektoren vermittelte Gentherapie**

In den letzten Jahren wurde der adeno-assoziierte Virus (AAV) als Vektor in der Gentherapie von Muskeldystrophien etabliert. Beim AAV handelt es sich um ein replikationsdefektes kleines Einzelstrang-DNA Virus ohne Hülle, welches nicht fähig ist, virale Gene zu exprimieren. Die Produktion des Virus setzt eine Co-Infektion mit einem zweiten “Helfer”-Virus voraus, um sich replizieren zu können. Der Hauptvorteil des AAV, verglichen mit anderen Vektoren, besteht in ihrer Effizienz, Skelett- und Herzmuskel nach einer intravenösen Injektion zu transduzieren. Darüber hinaus verursacht das Wildtyp-AAV keine bekannten Erkrankungen im Menschen und induziert nur eine schwache Immunantwort. Als nachteilig erweist sich jedoch die geringe Genomgröße, die das AAV trägt. Dadurch ist die Insertion eines großen Transgens wie Dystrophin nicht möglich. Bei der milden Becker Muskeldystrophie (BMD) besitzen die Patienten große Deletionen im Bereich nicht-essentieller Teile des Gens. Einige Studien basieren darauf, Minigene herzustellen, die diese Art von Mutationen nachbilden. Aber auch kleinere Mikrodystrophine mit größeren, nicht zusammenhängenden Deletionen werden eingesetzt. Ob diese Mini- und Mikrodystrophine in Großtiermodellen genauso wirksam sind wie es in der *mdx*-Maus gezeigt wurde, wird derzeit noch untersucht (Banks *et al.*,2007).

Neben dem Ersatz des Dystrophins selbst, existieren Ansätze, die das kleinere Paralog des Dystrophins, Utrophin, mittels AAV Vektoren in den Muskel einbringen sollen. Für ein Utrophintransgen konnte eine länger anhaltende Expression von Dystrophin in Folge eines adenoviralen Transfers in den Muskel von Mäusen mit einem völlig funktionsfähigen Immunsystem (Petrof,1999) gezeigt werden. Ein erfolgreicher adenoviraler Transfer von Utrophin in den Muskel mit dem Ergebnis einer Verbesserung des Phänotyps, konnte sowohl im *mdx* (Gilbert *et al.*,1999) als auch im *dko* (doppel knockout)-Muskel nachgewiesen werden (Wakefield *et al.*,2000). Um das Problem der limitierten Aufnahmekapazität von AAV Vektoren zu überwinden, wird ein Gen zwischen zwei AAV Vektoren aufgeteilt, von denen jeder einen Teil eines Introns mit sowohl einer Akzeptor- als auch einer Donorsequenz für den Spleißapparat enthält. Über die Bildung von head-to-tail Molekülen wird das gesamte Transgen rekonstruiert, das durch ein Intron unterbrochen ist. Dabei wird die Eigenschaft von AAV Vektoren ausgenützt, als Konkatemere in einer head-to-tail Konformation vorzuliegen. Posttranskriptionales Spleißen der resultierenden RNA entfernt die Introns. Dieser Ansatz wurde bereits vielversprechend eingesetzt, um ein Minidystrophin in alle Muskeln in der *mdx*-Maus einzubringen (Ghosh *et al.*,2007). Um gezielt die richtigen Organe zu erreichen und

dadurch die Toxizität zu verringern, werden Muskel-spezifische Promotoren eingesetzt. Dadurch wird die Expression auf die Muskelzellen beschränkt. Dies erniedrigt die Wahrscheinlichkeit, dass unerwünschte Immunantworten stimuliert werden. Die Generierung eines sehr vielversprechenden Kreatinkinase Promoters, der dazu fähig ist, hohe Expressionsraten selektiv im Skelett- und Herzmuskel zu erreichen, wurde bereits publiziert (Salva *et al.*,2007).

In den prä-klinischen Studien wurden hohe Virustiter verwendet. Somit sind beachtliche Fortschritte in der Vektorproduktion von Nöten, falls dieser Therapieansatz zum Einsatz in der Klinik kommt. Darüber hinaus sind Strategien entscheidend, die die Transduktionseffizienz erhöhen und die AAV Dosen reduzieren. Es wurden bereits verschiedene Serotypen (AAV6, AAV8 und AAV9) entwickelt, die eine verbesserte Gentransporteffizienz zum Muskel aufweisen (Wang *et al.*,2005; Gregorevic *et al.*,2006; Inagaki *et al.*,2006).

Eine der wichtigsten Limitierungen von viraler Gentherapie stellt die mögliche Immunantwort auf den Vektor und/oder das Transgen dar. Rekombinante AAV Vektoren enthalten keine viralen Gene, aber es wird erwartet, dass die Proteine des Vektor-Capsids eine humorale Immunantwort hervorrufen. In humanen Populationen sind Infektionen mit dem Wildtyp-AAV üblich (18–67%). Die Mehrheit der Versuchsobjekte besitzt Antikörper gegen AAV2 (Chirmule *et al.*,1999). Neutralisierende Antikörper können in den Tiermodellen die Transduktion durch AAV Vektoren verhindern oder vermindern. Des Weiteren kann die Verabreichung von AAV eine widerstandsfähige Immunreaktion gegen die Capsidproteine erzeugen, was sich als großes Hindernis für nachfolgende Behandlungen erweist. Da das Capsid nach der Verabreichung relativ schnell entfernt wird, sollte eine vorübergehende Immunsuppression eine zellvermittelte Antwort auf den Vektor selbst verhindern (Wang *et al.*,2007). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass man verschiedene Serotypen für nachfolgende Anwendungen verwendet.

Die Einführung neuer Epitope durch die Wiederherstellung der Dystrophinexpression führt eventuell ebenfalls zu Stimulierung des Immunsystems, wenn gleich dies in der Maus noch nicht beobachtet wurde (Ferrer *et al.*,2004). Es bleibt jedoch abzuwarten, ob humanes Dystrophin eine Immunantwort in DMD Patienten hervorruft.

### **Strategie des Überlesens der frühzeitigen Stopp-Codons**

Das Grundprinzip für Strategien zum Überlesen des Stopp-Codons stammt aus der Beobachtung, dass einige Antibiotika wie Aminoglykoside das Stopp-Codon unterdrücken

könnten. Ein gewisser Anteil der Mutationen im Dystrophin sind Nonsense-Mutationen (~7%; Muntoni und Abbs, persönliche Beobachtungen). Die Verabreichung von Aminoglykosiden könnte das Überlesen des frühzeitigen Stopp-Codons erlauben und dadurch die Produktion eines funktionellen Proteins ermöglichen.

Barton-Davies und Kollegen zeigten 1999 (Barton-Davis *et al.*,1999), dass die Behandlung von *mdx*-Mäusen mit Gentamicin eine erhöhte Dystrophinexpression zur Folge hatte (bis zu 20%) und auch zur Wiederherstellung des Dystrophinkomplexes am Sarkolemma zusammen mit einer verbesserten Resistenz gegenüber Dehnungskontraktionen führte. Nachfolgende klinische Untersuchungen waren enttäuschend: Wagner *et al.* (Wagner *et al.*,2001) behandelte zwei BMD Patienten und zwei DMD Patienten, die eine Mutation des Stopp-Codons trugen, mit Gentamicin. Den Patienten wurde einmal täglich intravenös 7,5 mg/kg Gentamicin zwei Wochen lang verabreicht. Jedoch konnte kein Volllängendystrophin nachgewiesen werden. Politano *et al.* (Politano *et al.*,2003) verabreichte vier DMD Patienten zwei 6-Tage-Zyklen lang täglich 7,5 mg/kg Gentamicin in einem Intervall von 7 Wochen. Die Behandlung induzierte die Entwicklung Dystrophin-positiver Fasern in einem Patienten. Jedoch wurde dieselbe Mutation zuvor mit einem milderem Phänotyp in Verbindung gebracht. Somit stellt die Dystrophinproduktion nur das Ergebnis eines spontanen Exon Skipplings des Exons mit der Mutation dar. Aufgrund von Bedenken bezüglich der Toxizität von Gentamicin bei einer regelmäßigen Verabreichung (Nephrotoxizität und Ototoxizität) wird die Suche nach besseren Alternativen vorangetrieben. PTC124 ist ein kleines Molekül, welches oral verabreicht bioverfügbar ist und die Ribosomen dazu befähigt Nonsense-Mutationen in mRNAs zu übergehen. Die Effektivität von PTC124, die Produktion eines Volllängendystrophins zu induzieren, wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der *mdx*-Maus evaluiert. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verabreichung von PTC124 in *mdx*-Mäusen die Produktion von Dystrophin auf eine Höhe von 20–25%, verglichen mit Muskeln von Kontrollmäusen, wiederherstellen kann. Teilweise wurden auch die Muskelkraft und die Resistenz des Muskels gegenüber exzentrischen Anstrengungen wiederhergestellt (Welch *et al.*,2007). Zudem wurde auch die Serumkreatinphosphokinase durch diese Behandlung reduziert, wohingegen kein Nachweis erbracht werden konnte, dass die Behandlung zum Überlesen normaler Stopp-Codons führt.

Neben den Bedenken, dass sich auf lange Sicht eine Toxizität entwickeln kann, besteht das Hauptproblem bei Gentamicin in der Wirksamkeit, wenn es darum geht verschiedene Stopp-Codons zu überlesen. Die Wirksamkeit nimmt dabei von UGA über UAA nach UAG ab (Bidou *et al.*,2004). Im Falle von PTC124 existiert keine Abhängigkeit vom Typ des Stopp-

Codons. Es gibt die theoretische Möglichkeit, dass die Genauigkeit der Translation verloren geht und es dadurch zu umfassenden Fehltranslationen kommt, da auch jede andere mRNA falsch abgelesen werden kann. Jedoch besitzen Gene normalerweise mehrere Stopp-Codons am 3'-Ende. Dadurch wird das Risiko verringert, dass ein Überlesen aller physiologischen Stopp-Codons stattfindet.

Es wurden bereits zwei Phase I Studien zur Sicherheit und Pharmakokinetik von PTC124 in gesunden freiwilligen Erwachsenen durchgeführt. Diese Studien ergaben, dass das Medikament im Allgemeinen gut verträglich ist (Welch *et al.*,2007). Als Nebenwirkungen zeigten sich nur leichte Kopfschmerzen, Schwindel und Magen-Darm-Probleme bei der höchsten Dosis. Eine Phase IIa Studie zu PTC124 in Jungen mit DMD und Nonsense-Mutationen wurde an drei Standorten in den USA durchgeführt. In dieser Studie erhielten 38 Jungen (5 bis 17 Jahre) 28 Tage lang eine Behandlung mit einer von drei Dosen PTC124. Vier von sechs Patienten, die mit einer niedrigeren Dosis behandelt wurden und 10 von 20 Patienten, denen eine mittlere Dosis verabreicht wurde, zeigten im Anschluss an die Behandlung in der Immunofärbung eine Zunahme der Expression von Dystrophin. Zudem konnte eine signifikante Verringerung an Serumkreatinkinase beobachtet werden. Jedoch konnten keine Verbesserungen bezüglich der Muskelkraft gesehen werden. Bislang konnten keine signifikanten Unverträglichkeiten beobachtet werden.

### **Hochregulierung der Utrophinexpression**

Zwischen Dystrophin und Utrophin besteht ein bemerkenswerter Grad an funktioneller Redundanz, was einen Hinweis darauf gibt, dass ihre verschiedenen Funktionen sich mehr auf das genaue Expressionsmuster beziehen als auf unterschiedliche biochemische oder physikalische Eigenschaften. Dies konnte funktionell gezeigt werden, indem eine Überexpression von Utrophin den dystrophen Phänotyp in *mdx*-Muskeln verbessern konnte. Neben dem Ansatz des AAV vermittelten Transfers von Utrophin in den Muskel, wie bereits im Abschnitt zur Gentherapie mit Adeno-assoziierten viralen Vektoren beschrieben wurde, gibt es einen weiteren therapeutischen Ansatz, welcher die Hemmung der Herunter- und/oder Hochregulierung des endogenen Utrophin im Skelettmuskel beinhaltet. Eine 2- bis 3-fache Zunahme des stationären Proteinlevels konnte durch den Einsatz kleiner diffusionsfähiger chemischer Verbindungen erreicht werden. Der Vorteil besteht darin, dass eine stabile Expression von Transgenen im Skelettmuskel umgangen werden kann. Im Zuge der Behandlung von Patienten mit solchen kleinen Molekülen, welche dazu in der Lage sind, die Transkription von Genen zu manipulieren, die funktionell ähnliche Proteine kodieren, konnte klinisch eine Verbesserung nachgewiesen werden. Die Hochregulierung eines Proteins konnte

das Fehlen des anderen Proteins kompensieren. Des Weiteren müssen pharmakologische Substanzen nicht notwendigerweise strikt Gewebe-spezifisch sein, da eine ubiquitäre Überexpression des Zielproteins in der *mdx*-Maus keine Hinweise auf eine Toxizität ergab (Tinsley *et al.*,1996; Deconinck *et al.*,1997b; Tinsley *et al.*,1998; Fisher *et al.*,2001).

Aufgrund der Identifizierung und Charakterisierung der Transkriptionsmechanismen innerhalb der Utrophinpromotoren, konnten kleine Moleküle entwickelt werden, die auf diese Prozesse einwirken können (Corbi *et al.*,2000; Blottner *et al.*,2001). Untersuchungen von gesunden adulten Mäusen und von *mdx*-Mäusen sowie zusätzlich in entsprechenden Myoblasten *in vitro* weisen darauf hin, dass die Behandlung mit L-Arginin, NO oder Hydroxyurea den Utrophinspiegel erhöht und die Lokalisation am Sarkolemma fördert (Chaubourt *et al.*,1999; Chaubourt *et al.*,2002). Die weitere Charakterisierung der Genregulation von Utrophin ist nötig, um weitere Methoden zu entwickeln, die eine Hochregulierung des Utrophin im dystrophen Gewebe bewirken zu können.

#### 1.3.2.3 Glukokortikosteroidtherapie der Duchenne Muskeldystrophie

Die erste Studie, die sich mit der Verwendung von Steroiden zur Therapie von DMD beschäftigt hat und einen positiven Effekt zeigen konnte, war die Studie von Drachman *et al.* (Drachman *et al.*,1974). Seitdem wurden viele Studien durchgeführt, in denen Patienten mit Steroiden behandelt wurden. In einigen Studien verbesserte sich die Kraft und die funktionellen Eigenschaften in Folge einer Steroidgabe bei DMD (Brooke *et al.*,1987; Mendell *et al.*,1989; Fenichel *et al.*,1991a; Fenichel *et al.*,1991b; Griggs *et al.*,1991; Angelini *et al.*,1994). In fünf Studien wurde den Teilnehmern entweder Prednison/Prednisolon oder Deflazacort (DFZ) verabreicht und verschiedene Endpunkte mit denen der Placebogruppe verglichen. Die Verlängerung der Gehfähigkeit wurde als Messgröße für den Erfolg der Therapie nur in einer Studie eingesetzt (Angelini *et al.*,1994). Drei Studien wiesen eine verbesserte Muskelfunktion und Kraft über eine Dauer von 6 Monaten nach (Brooke *et al.*,1987; Fenichel *et al.*,1991a; Fenichel *et al.*,1991b). Eine Studie demonstrierte eine Stabilisierung der Muskelkraft und Muskelfunktion über einen Zeitraum von bis zu 2 Jahren (Angelini *et al.*,1994). In dieser Studie wurde Deflazacort eingesetzt. DFZ besitzt einen geringeren Effekt auf den Verlust von Knochenmasse der Wirbel, was für heranwachsende Kinder besonders wichtig ist. DFZ wurde aufgrund dieses „knochenschonenden“ Effekts zur Therapie von DMD verwendet (Mesa *et al.*,1991; Angelini *et al.*,1994). Nachfolgende Studien zeigten eine ähnliche Wirksamkeit von Prednison unter Umständen mit einem geringeren Risiko der Gewichtszunahme (Bonifati *et al.*,2000; Bonifati *et al.*,2006). Eine

andere Studie (Biggar *et al.*,2001) untersuchte die Langzeitbehandlung mit DFZ, die zu einer verbesserten Aufrechterhaltung der Lungenfunktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen führte. Eine positive Langzeitwirkung bezüglich der Herzfunktion durch DFZ-Gabe wurde nach einer Behandlung über 5 Jahren beobachtet (Silversides *et al.*,2003).

Somit kann belegt werden, dass die Behandlung mit Steroiden über einen kürzeren Zeitraum, z.B. für 6 Monate bis zu 2 Jahren, signifikant die Muskelkraft und -funktion bei DMD verbessern können. Auch zeigen sich zunehmend Hinweise für eine positive Langzeitwirkung. Die Applikation von Prednisolon und Deflazacort wies in Langzeit-Kohorten-Studien Verbesserungen auf: eine Verlängerung der Gehfähigkeit von einem mittleren Alter von 10 Jahren auf ein mittleres Alter von 14,5 Jahren, die Erhaltung der Lungenfunktion, die seltenere Notwendigkeit einer Skolioseoperation und eventuell eine geringere Häufigkeit einer Kardiomyopathie. Eine Langzeitbehandlung mit Steroiden führt zu einem veränderten Verlauf der Erkrankung und die Patienten bleiben länger gehfähig, wenn die Behandlung zu einem Zeitpunkt einsetzt, zu dem die Patienten noch eine erhaltene Gehfähigkeit haben und noch kein signifikanter Verlust der Funktion besteht (Bonifati *et al.*,2006).

Dennoch ist eine Langzeitbehandlung mit Glukokortikoiden aufgrund der Nebenwirkungen nur bedingt möglich. In einer aktuellen Studie von Kirschner *et al.* wurde als Alternative zur Behandlung mit Glukokortikoiden das Immunsuppressivum Ciclosporin A (3,5-4,0 mg/kg pro Tag) zunächst für 3 Monate und anschließend weitere 12 Monate verabreicht (Kirschner *et al.*,2010). Zuvor wurde in zwei offenen Studien ein positiver Effekt auf die freigestellte und stimulierte Kraftentwicklung nach einer täglichen Verabreichung von 5 mg/kg bei DMD Patienten gezeigt (Sharma *et al.*,1993; Miller *et al.*,1997). Es konnte auch eine positive Wirkung von Ciclosporin A in der *mdx*-Maus nachgewiesen werden (De Luca *et al.*,2005). Die Verabreichung von Ciclosporin A zeigte in der Studie von Kirschner *et al.* jedoch keine Verbesserungen verglichen zur Placebo-Gruppe bezüglich der Muskelkraft. Gemäß diesen Ergebnissen, wurde auch keine signifikante Wirkung bei einer der weiteren Untersuchungen, einschließlich der Dynamometrie, der Fähigkeit und der Zeit, sich aus der Rückenlage zu erheben, der Fähigkeit und der Zeit, ohne Hilfe 10 m zu gehen und der KINDL Lebensqualitätsbeurteilung, beobachtet. Auch die periodische Verabreichung von Prednison kombiniert mit der Gabe von Ciclosporin A lieferte keine Ergebnisse, die von der alleinigen periodischen Verabreichung von Prednison abwichen (Kirschner *et al.*,2010).

Angesichts der langen Zeitspanne, die junge DMD Patienten mit Steroiden behandelt werden, ist es wichtig, die Prävalenz und den Umgang mit Nebenwirkungen der Langzeitbehandlung

anzusprechen, die eine Gewichtszunahme, Verhaltensänderungen, Osteoporose und Katarakte einschließen (Larson *et al.*,2000; McDonald *et al.*,2002; Talim *et al.*,2002; Bianchi *et al.*,2003; Quinlivan *et al.*,2005).

Steroide wirken auf die Regulation der Signalweitergabe, wobei der genaue Wirkmechanismus, der zur Verbesserung der Muskelkraft im DMD Patienten führen, noch nicht klar ist. Möglicherweise beruht die Wirkung der Glukokortikoide bei dieser Erkrankung auf Mechanismen, die die Stabilität der Muskelfasermembranen erhöhen (Jacobs *et al.*,1996), die myogene Reparatur verbessern (Anderson *et al.*,2000) oder die differentielle Genregulation der Muskelfasern verändern (Fisher *et al.*,2005). Im Falle von DFZ ist die positive Wirkung auf den Muskel assoziiert mit der Aktivität des Calcineurin/nuclear factor des aktivierten T-Zellen (NF-AT) Signalweges (St-Pierre *et al.*,2004). Ein direkter Einfluss auf die Muskeldegeneration wurde in *C. elegans* beobachtet (Gaud *et al.*,2004). Prednison reduziert die Muskelzelledegeneration um 40%. Andere Hypothesen beschreiben, dass Steroide die Muskelnekrose und Inflammation vermindern. Mögliche alternative Wirkungen von Steroiden beruhen auf der Modulierung der Zellantwort auf Inflammation. Eine Erhöhung der Proliferation myogener Vorläuferstammzellen oder Myoblasten durch Steroidgabe und eine Steigerung der Muskelregeneration und des Muskelwachstums aufgrund ihrer anabolen Wirkung wurden beschrieben (Sklar *et al.*,1991; Pasquini *et al.*,1995; Rifai *et al.*,1995). Skelettmuskulatur entsteht aus mehrkernigen Zellen postmitotischer Fasern, die aus mononukleären Vorläufern wie Satellitenzellen entstehen. An der pathologischen Veränderung während einer Muskeldystrophie sind sekundäre Inflammationsreaktionen der Zellen und der Umbau von Muskelfasern zu fibrotischem Gewebe beteiligt. Eine Studie zum Proteinmetabolismus kam zu dem Schluss, dass die positive Wirkung von Steroiden bei DMD in Verbindung steht mit der erhöhten Muskelmasse aufgrund der Inhibierung der Proteolyse (Rifai *et al.*,1995). Steroide wirken möglicherweise als direkte Modifizierer der Transkription, um die Dystrophinexpression in “revertanten Fasern” zu steigern oder die Menge synergistischer Moleküle zu erhöhen, wie die der Muskelglykoproteine, welche die Tätigkeit des Dystrophin ergänzen (Hardiman *et al.*,1993). Methylprednisone hat einen selektiven Einfluss auf Dystrophin in Kultur und erhöht die Menge an Utrophin und Satellitenzellen (Sklar *et al.*,1991).

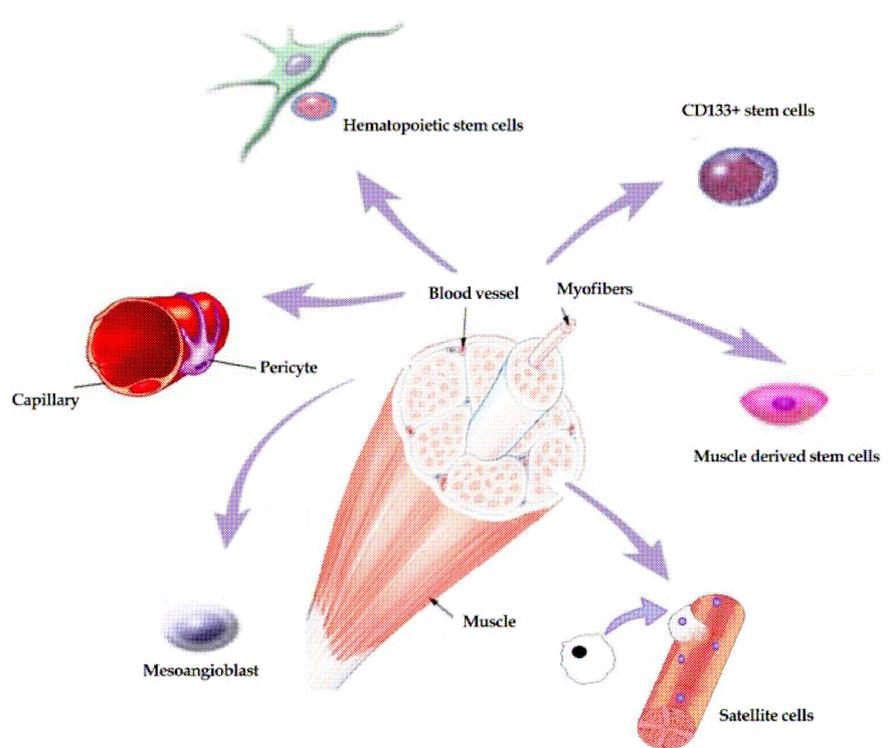
Aus den Standards of Care (SOP) des TREAT-NMD Network ist zu entnehmen, dass der beste Zeitpunkt, um mit der Behandlung der DMD mit Glukokortikosteroiden zu beginnen, noch vor dem Erreichen des Plateaus der physischen Leistungsfähigkeit der Kinder liegt. Dieser Zeitpunkt befindet sich im Alter zwischen 4-6 Jahren. Die übliche Dosierung liegt bei

0,75 mg/kg/Tag Prednison/Prednisolon und 0,9 mg/kg/Tag Deflazacort (<http://www.treat-nmd.eu/patients/DMD/dmd-care/>).

### 1.3.2.4 Zellbasierte Strategien

In den letzten Jahren gewannen Stammzellen als mögliche Grundlage zellbasierter Therapien verschiedener humaner Erkrankungen, wie Leukämie (Owonikoko *et al.*,2007) und Parkinson (Singh *et al.*,2007), immer mehr an Bedeutung.

Einige Jahre nach ihrer Entdeckung wurden Satellitenzellen als die einzigen Zellen betrachtet, die für das Wachstum und den Erhalt der Skelettmuskulatur verantwortlich sind. In Folge der Verbesserung der Techniken zur Isolierung von Zellen konnten einige muskuläre- und nichtmuskuläre Subpopulationen identifiziert werden, die sich aktiv an der Myogenese beteiligen können. Neuere Arbeiten beschreiben die teilweise Identifizierung und Charakterisierung von Stammzellen, welche in Kultur von zahlreichen adulten Geweben abstammen. Im Skelettmuskel selbst konnten abgesehen von Satellitenzellen noch weitere adulte Vorläuferzellpopulationen mit myogenen Eigenschaften gefunden werden: muskel-abgeleitete Stammzellen (MDSCs), Muskelnebenzellpopulationen (mSP) und muskel-abgeleitete CD133+ Vorläufer (Abb. 4).



**Abb. 4: Mögliche Quellen myogener Stammzellen aus Blut und Muskel (Farini *et al.*,2009).**

Einige Arbeiten beschreiben die Beteiligung von nicht-muskulären Stammzellen an der Myogenese: die Knochenmark-abgeleiteten mesenchymalen Stammzellen (MSC) können sich

in mesodermale Zellen einschließlich Myoblasten (Prockop,1997; Pittenger *et al.*,1999) differenzieren. Aus dem Blut konnte eine Subpopulation an CD133+ Zellen isoliert werden, die eine wichtige Rolle während der myogenen Entwicklung spielen (Torrente *et al.*,2004). Des Weiteren wurden in der dorsalen Aorta von Vögeln und Säugetieren sogenannte gefäßassoziierte Mesoangioblasten (Cossu *et al.*,2003) und Perizyten identifiziert (Dellavalle *et al.*,2007). Somit stellt die Rekrutierung von ortsansässigen und zirkulierenden Vorläufern zur Myogenese eine zentrale Rolle bei der Unterstützung der Funktionalität des Muskelgewebes dar.

Die Stammzelltherapie ist eine attraktive Methode zur Behandlung von Muskeldystrophien, da nur eine kleine Anzahl an Zellen zusammen mit einem stimulierenden Signal ausreichend sind, um eine therapeutische Wirkung zu erreichen (Price *et al.*,2007). Die klinisch relevanten Stammzellpopulationen müssen einfach zu extrahieren sein und sich weiterhin differenzieren können. Zudem müssen sie sich nach der Transplantation in den Muskel integrieren können, um funktionell den dystrophen Phänotyp zu verbessern (Price *et al.*,2007). Stammzellpopulationen mit einem myogenen Potential können von vielen Körperregionen in verschiedenen Entwicklungsstadien abgeleitet werden. Das Überleben und die anschließende Migration von der Injektionsstelle zum Muskel sind bei vielen Zellpopulationen wenig optimal. Der Mechanismus, der für das Überleben und die Proliferation myogener Zellen nach der Transplantation verantwortlich ist (Parise *et al.*,2006), und geeignete Wachstumsfaktoren wurden identifiziert (Charge *et al.*,2004). Dies sollte bald zur Verbesserung zell-basierter Therapien zur Behandlung von Muskeldystrophien führen. Mesoangioblasten (Cossu *et al.*,2003), Muskel-SP (side population) (Asakura *et al.*,2002) und aus Blut abgeleitete CD133+ (Gavina *et al.*,2006) besitzen die Fähigkeit durch das Gefäßsystem zu wandern. In Zukunft sollte sich durch neue Methoden, aufgrund der Identifikation von Zelloberflächenmarkern, wie Adhäsionsmolekülen (Torrente *et al.*,2003b) und geeigneter Wachstumsfaktoren (Horsley *et al.*,2003; Torrente *et al.*,2003a), die Migrationsfähigkeit von Stammzellpopulationen verbessern.

Neuere Daten zeigen, dass ein myogenes Potential in Zellen vorhanden ist, die mit Blutgefäßen verbunden sind. Tatsächlich scheinen Perizyten, die entlang der Kapillaren lokalisiert sind, Eigenschaften multipotenter mesenchymaler Vorläufer zu besitzen (Schor *et al.*,1995; Doherty *et al.*,1998).

Vergleicht man die potentiellen Stammzellpopulationen, scheinen die Mesoangioblasten die meisten Kriterien für die Verwendung bei der Behandlung von DMD zu erfüllen. Mesoangioblasten besitzen eine ausgedehnte Verteilung und sind in Folge einer Behandlung

mit Wachstumsfaktoren dazu fähig, den dystrophen Phänotyp zu verbessern. Allerdings könnte die Vorbehandlung anderer myogener Stammzellen mit Wachstumsfaktoren auch deren Fähigkeit erhöhen, den dystrophen Phänotyp zu verbessern.

Bei Satellitenzellen handelt es sich um einen der ersten Zelltypen, die für zell-basierte Therapien der Muskeldystrophie eingesetzt wurden (Conway *et al.*,1997; Tremblay *et al.*,1998). Aufgrund der guten Ergebnisse aus Versuchen in Mausmodellen, wurden diese Stammzellen in einigen klinischen Studien verwendet. Leider wurde deutlich, dass die Transplantation von Myoblasten eine ineffiziente Technik darstellt. Die geringe Effizienz der Dystrophinproduktion in Muskelfasern von DMD Patienten führte zu keiner funktionellen oder klinischen Verbesserung bei den behandelten Kindern (Peault *et al.*,2007). Das Überleben der Donorzellen wurde durch das Empfängerimmunsystem begrenzt. Eine Immunsuppression war während der Zelltherapie nötig, sogar wenn die Donormyoblasten an die humanen Leukozytenantigene angeglichen wurden (HLA-matched) (Khan *et al.*,1999). Daraufhin wurde der Fokus darauf gelegt, die Therapie zu optimieren, indem Zellpopulationen gesucht wurden, die ursprünglicher als Satellitenzellen sind. Dazu gehören Muskel-abgeleitete Stammzellen (MDSCs), Muskel-SP Zellen und hämatopoetisch abgeleitete Muskelstammzellen. 2007 wurde eine Studie in einem 26-jährigen Duchenne Muskeldystrophie Patienten (Skuk *et al.*,2007) publiziert. Der Patient erhielt normale Muskelvorläuferzellen, welche *in vitro* vermehrt wurden. Zusätzlich wurde dem Patienten das Immunsuppressivum Tacrolimus verabreicht. Einen Monat nach der Transplantation exprimierten 27,5% der Muskelfasern auf der behandelten Seite des *M. gastrocnemius* von den Donorzellen stammendes Dystrophin und 34,5% nach 18 Monaten. Der kontralaterale *M. gastrocnemius* blieb Dystrophin-negativ. Somit ist eine intramuskuläre Zelltransplantation in DMD Patienten durchführbar und eine Langzeitexpression des von den Donorzellen stammenden Dystrophins konnte beobachtet werden. Die Anwendbarkeit dieser Methode bleibt dennoch auf Bereiche des Skelettmuskels beschränkt, die über die Körperoberfläche zugänglich sind.

Der bereits oben erwähnte Therapieansatz des Exon-skipping ist bei bis zu 70% der DMD Patienten anwendbar. Zudem können Probleme, die mit der Verteilung des großen Vollständigendystrophingens oder eines verkürzten, weniger funktionellen Minigens verbunden sind, vermieden werden. Aus dem peripheren Blut und dem Skelettmuskel abgeleitete DMD CD133+ Zellen wurden zunächst isoliert. Anschließend wurde überprüft, ob diese nach der Transduktion mit einem Lentivirus, der ein Konstrukt zum Exon-skipping von Exon 51 trug, in der Lage waren, die verkürzte, Exon-geskippte Version des humanen Dystrophin zu

exprimieren (Goyenvalle *et al.*,2004; Denti *et al.*,2006). Die transduzierten, von Blut und Muskel abgeleiteten Stammzellen konnten *in vivo* mit regenerativen Fasern fusionieren und exprimierten nicht nur das funktionelle humane Dystrophin, sondern auch die Dystrophin-assoziierten Proteine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sarkoglykan. Jedoch führte die intramuskuläre Transplantation nur zu einer lokalen Regeneration, wohingegen die Pathologie der DMD die gesamte Skelett- und Herzmuskulatur im Körper betrifft. Dadurch erfordert die wirksame Behandlung der DMD eine Methode, welche es ermöglicht die injizierten Zellen zu den entsprechenden Stellen zu transportieren. Um dieses Problem zu umgehen, wurden transduzierte CD133+ Stammzellen intra-arteriell injiziert. Die Analyse der Muskelkraft und der Ausdauer nach der intra-arteriellen Transplantation dieser Zellen deuten stark darauf hin, dass die Verteilung der Zellen über diesen Ansatz die Morphologie verbessert und dass in der Maus die Skelettmuskelfunktion signifikant bis zum annähernd normalen Zustand wiederhergestellt wird.

Der Einsatz des Exon-skipping zur Expression von humanem Dystrophin in DMD CD133+ Zellen erlaubt die Verwendung Patienten-eigener Stammzellen mit einem wesentlich verringerten Risiko der immunologischen Abstoßung des Transplantats (Riviere *et al.*,2006). Möglicherweise können in Zukunft Stammzellen von DMD Patienten isoliert und *ex vivo*, durch lentiviral induziertes Exon Skipping des Exons 51 (Benchaouir *et al.*,2007) oder mittels Zinkfingernukleasen (Zeng *et al.*,2008), manipuliert und der Gendefekt korrigiert werden. Anschließend könnten diese Zellen wieder in den Donor intra-arteriell injiziert werden. Die intra-arterielle Injektion der Patienten-eigenen Stammzellen erlaubt die systemische Verteilung der Zellen in der gesamten Muskulatur des Körpers. Die vielversprechenden Entwicklungen, zellbasierte Therapieansätze mit einer Gentherapie zu kombinieren, geben DMD Patienten und deren Familien Hoffnung für zukünftige autologe Stammzelltherapien.

## 2 Zielsetzung: Neue Ansätze für die molekulare Therapie bei der DMD

Aufbauend auf den eingangs erwähnten Methoden und Ansätzen zur Therapie der Duchenne Muskeldystrophie, wird deutlich, dass nicht alle Patienten mit diesen Therapieansätzen behandelt werden können. Oft ist die Wirksamkeit der Therapien abhängig von der Art der Mutation im Dystrophingen. Um nur einige Beispiele zu erwähnen, können im Falle des Exon-skipping nur Mutationen behandelt werden, die zur Verschiebung des Leserasters führen. Zudem reicht ein AON nicht aus, um alle Leserasterverschiebungen aufheben zu können, sondern es müssen z.T. verschiedene Exons geskippt werden, um den Phänotyp zu lindern. Methoden, die darauf basieren vorzeitige Stopp-Codons zu Überlesen, müssen in Folge einer Mutation ein solches Stopp-Codon aufweisen. Die Behandlung mit Glukokortikoiden ist aufgrund der vielen Nebenwirkungen ebenfalls nur eingeschränkt möglich. Somit ist es offensichtlich, dass weitere Ansätze zur Therapie der DMD nötig sind, um möglichst vielen Patientengruppen eine Behandlung der Erkrankung zu ermöglichen.

Ziel dieser Arbeit ist es daher zwei neue Ansätze basierend auf dem *mdx*-Mausmodell zu entwickeln, die geeignet sind, um bei weiteren Gruppen von Patienten zum Einsatz zu kommen. Diese beiden neuen Ansätze sollen hier auf ihre Plausibilität und Machbarkeit überprüft werden.

### 2.1 Präklinische Validierung zweier Carboanhydrase-Inhibitoren in der *mdx*-Maus

Carboanhydrasen (CA) sind eine Familie von Metalloenzymen, die verschiedene Gewebeverteilungen aufweisen und im Säugetier intrazellulär lokalisiert sind (Lindskog, 1997; Supuran *et al.*, 2003; Pastorekova *et al.*, 2004). Carboanhydrasen selbst katalysieren die schnelle Umsetzung von CO<sub>2</sub> zu Bikarbonat und H<sup>+</sup> (Wasserstoffionen).

Es existieren fünf zytosolische Isoformen (CA I–III, CA VII und CA XIII), fünf membranständige Isozyme (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV und CA XV), zwei mitochondriale Formen (CA VA und CA VB), sowie das sezernierte CA Isozym, CA VI. Carboanhydrasen spielen eine entscheidende Rolle in physiologischen Prozessen, welche verbunden sind mit der Atmung und mit dem Transport von CO<sub>2</sub>/Bicarbonat zwischen Stoffwechsel-betreibenden Geweben und der Lunge. Darüber hinaus sind sie an der Regulation von pH-, CO<sub>2</sub>-Homöostase, Elektrolytsekretion in einer Vielzahl von Geweben und Organen, biosynthetischen Reaktionen, Knochenbildung, Verkalkung, Tumorbildung und

vielen anderen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt (Hewett-Emmett,2000; Supuran *et al.*,2000; Supuran,2008).

Wetzel und Kollegen beschrieben 2007 die Lokalisation der CA XIV im Skelettmuskel. Dabei wurde ermittelt, dass die membrangebundene CA Isoform, CA XIV, an der Plasmamembran und an der Membran des sarkoplasmischen Retikulums (SR) des Mausskelettmuskels lokalisiert ist (Wetzel *et al.*,2007). Frühere Studien von Sender und Kollegen (Sender *et al.*,1994) sowie Decker und Kollegen (Decker *et al.*,1996) zeigten, dass die CA IV in Endothelzellen von Kapillaren und an der Plasmamembran des Skelettmuskels von Ratte und Mensch exprimiert wird.

Scheibe *et al.* untersuchten mittels konfokaler Laserrastermikroskopie (CLSM) die Lokalisation von CA IV und CA IX innerhalb der Zelle im Skelettmuskel, insbesondere im Sarkolemm. CA IX liegt im Bereich des transversalen tubulären bzw. terminalen Sarkolemms (Scheibe *et al.*,2008).

Es existieren Untersuchungen zur Carboanhydrasedefizienz bzw. -inhibition im murinen Skelettmuskel. Dazu gehören Untersuchungen isometrischer Einzelkontraktionen und tetanischer Kontraktionen von isolierten Faserbündeln des schnell kontrahierenden *Extensor digitorum longus* Muskels (EDL) und des langsam kontrahierenden *Soleus* Muskels (Sol) in CA-defizienten Tieren ebenso wie Untersuchungen des Ermüdungsverhaltens (Scheibe *et al.*,2008). Muskelfasern, die entweder defizient für CA IV oder defizient für CA IX waren, zeigten keine von Wildtypmuskelfasern (wt) abweichende Muskelfunktion. Die Muskelfunktion von CA IV/XIV Knockout (dko) Mäusen zeigte eine Abnahme der Anstiegs- und Relaxationszeit und der Kraft der Einzelkontraktionen. Im Gegensatz dazu bewirkt eine Exposition gegenüber dem CA Inhibitor Dorzolamid (DZ) sowohl bei wt als auch bei CA IV/XIV dKO Muskelfasern, die allein CA IX exprimieren, eine Zunahme der Anstiegszeit und der Maximalkraft der Einzelkontraktion. Aufgrund dieser Ergebnisse, wird vermutet, dass eine Inhibition der CA-Isoform am sarkoplasmatischen Retikulum (SR-CA) stattfindet. Die Inhibition von nur einer SR-CA Isoform scheint im Gegensatz zur Inhibition von allen drei Isoformen IV, IX und XIV keinen Einfluss auf die Muskelkontraktion zu haben (Scheibe *et al.*,2008; Crocetti *et al.*,2009).

Somit stellen diese im Skelettmuskel exprimierten Isoformen IV, IX und XIV und vor allem die an das SR-gebundene CA interessante Kandidaten für therapeutische Ansätze dar, die auf der Inhibition der CAs im Skelettmuskel beruhen.

Im ersten Ansatz wurden zwei Vertreter der Substanzgruppe der Carboanhydrase-Inhibitoren auf ihre Wirksamkeit im Duchenne Mausmodell *mdx* untersucht. Grundlage zu den

Experimenten in der vorliegenden Arbeit bilden Ergebnisse eines Medikamentenscreens im *C. elegans* Modell *dys-1; hhh-1*. In diesem Modell entwickelte der Fadenwurm mit einer Mutation des *dys-1* Gens in Verbindung mit einer milden *MyoD*-Mutation einen muskeldegenerativen, annähernd unbeweglichen Phänotyp (Gaud *et al.*,2004; Segalat,2006; Segalat,2007). Dieses Modell wurde für die Prüfung von mehr als 1000 zugelassenen Medikamenten herangezogen, um Moleküle zu identifizieren, die fähig sind diesen Phänotyp zu verbessern. Schließlich erhielt man mehr als 20 aktive Substanzen, die das Potential besitzen, den unbeweglichen Phänotyp korrigieren zu können. Zwei dieser wirksamen Substanzen, Methazolamid und Dichlorophenamid, sind Carboanhydraseinhibitoren der Klasse der Sulfonamide, die starke selektive Inhibitoren von CAs im Menschen darstellen (Supuran *et al.*,2003). Bei Methazolamid handelt es sich um einen starken Inhibitor der membrangebundenen Isoform CA IX und der *C. elegans* Carboanhydrase *cah-4* (Scheibe *et al.*,2008; Crocetti *et al.*,2009). Da CAs an vielfältigen Prozessen mitwirken, stellen sie ein wichtiges therapeutisches Ziel dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese im Wurm wirksamen Substanzen im Dystrophindefizienten *mdx*-Mausmodell getestet. Carboanhydraseinhibitoren zählen bereits zu den zugelassenen Arzneimitteln. Deshalb erscheint eine klinische Entwicklung im Menschen aufgrund der bereits nachgewiesenen Verträglichkeit sehr vielversprechend zu sein, wenn sich ein positiver Effekt auf den dystrophen Phänotyp auch in der Maus bestätigt.

## 2.2 Entwicklung eines neuen Mausmodells (*dys*<sup>-/-</sup>/*chip*<sup>-/-</sup> bzw. *dys*<sup>-y</sup>/*chip*<sup>-/-</sup>)

In der Muskeldystrophie Duchenne kommt es zu einer Reihe von molekularen pathologischen Ereignissen, bei denen Muskelgewebe in Fett- und Bindegewebe umgewandelt wird. Dabei werden Muskelproteine verstärkt abgebaut. Dies stellt einen wichtigen Teil der Pathogenese der Muskeldystrophie dar. Der Abbau der Muskulatur ereignet sich dann, wenn die Proteindegradationsrate die Proteinsyntheserate übersteigt. Eine erhöhte Proteinabbaurate, wie sie in der Muskeldystrophie Duchenne zu finden ist, beruht auf der erhöhten Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems (Cao *et al.*,2005). Verbesserungen der Pathologie in der *mdx*-Maus nach Inhibition des proteasomalen Abbaus durch die Substanz MG-132 (Bonuccelli *et al.*,2003) lassen darauf schließen, dass das Eingreifen auf der Ebene des Muskelproteinabbaus einen weiteren vielversprechenden Ansatz zur Therapie der DMD darstellt.

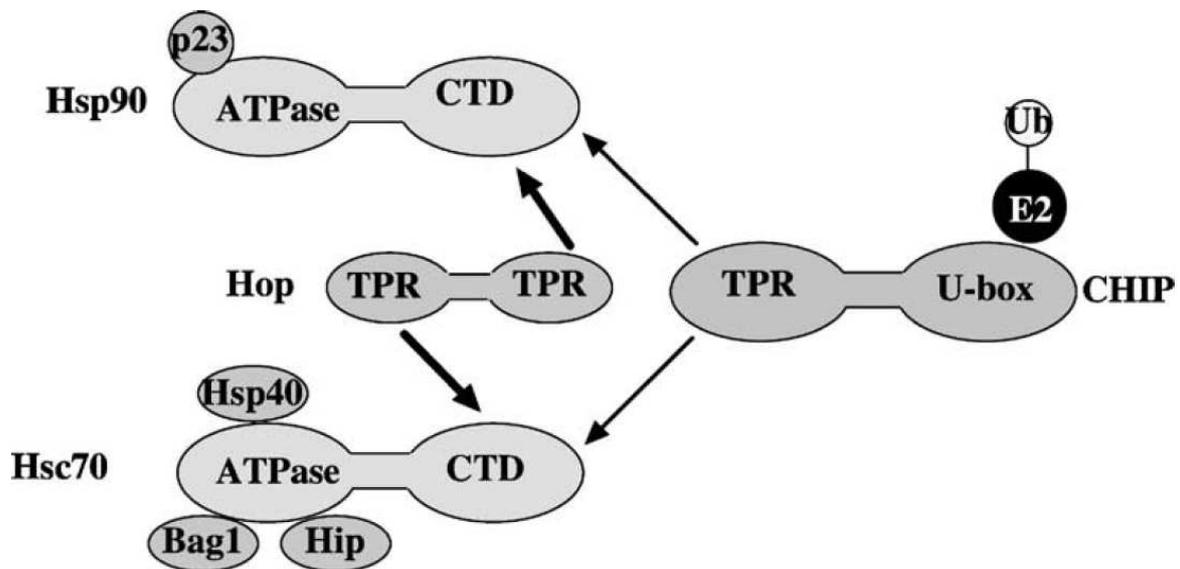
Untersuchungen an der annähernd unbeweglichen *C. elegans* Doppelmutante *dys-1; hhh-1* charakterisieren ein Gen, das an der Regulation des Muskelproteinabbaus beteiligt ist (Nyamsuren *et al.*,2007). Das Gen kodiert die E3/E4 Polyubiquitinligase CHN-1, die an der

Regulation des Abbaus sarkomerer Proteine mitwirkt. Das humane Homolog zu CHN-1 ist CHIP (carboxyl terminus of the Hsp70-interacting protein). CHN-1 bildet im Wurm einen Komplex mit CDC-48 und UFD-2, worüber der Protein-Turnover des Chaperons UNC-45 gesteuert wird. Dieses spielt eine entscheidende Rolle beim Assembly von Myosin in Myofibrillen (Hoppe *et al.*,2004). Der Knockout von *chn-1* konnte im Wurm den unbeweglichen Phänotyp verbessern (Nyamsuren *et al.*,2007).

Im zweiten Ansatz sollen die Ergebnisse aus den Untersuchungen in der *C. elegans* Doppelmutante *dys-1; hhh-1* (Nyamsuren *et al.*,2007) aufgegriffen und ein neues Mausmodell etabliert werden, welches zusätzlich zum *mdx*-Hintergrund einen *chip*-Knockout aufweist. In wie weit ein Knockout von *chip* die Sarkomerstabilität und somit den Erhalt der Muskelkraft beeinflussen kann, soll in dieser Arbeit durch die Kreuzung von *chip*<sup>+/-</sup> Mäusen mit *mdx*-Mäusen untersucht werden.

Das neue Mausmodell (*dys*<sup>-/-</sup>/*chip*<sup>-/-</sup> bzw. *dys*<sup>-y</sup>/*chip*<sup>-/-</sup>) soll dazu dienen, die Reduktion des Proteinabbaus im Muskel durch den Knockout der muskelspezifischen E3/E4-Ligase CHIP zu untersuchen. Sollten diese Untersuchungen im neuen Mausmodell erfolgversprechende Ergebnisse liefern, dann könnte künftig eine adenovirale Herunterregulierung der E3/E4-Ligase CHIP für den Einsatz im Patienten in Erwägung gezogen werden.

CHIP wurde ursprünglich als ein Hsp70 Cochaperon mit einem Tetratricopeptid Repeat Motiv (TRP) und einer U-Box Domäne identifiziert (Ballinger *et al.*,1999). Das TPR Motiv am N-Terminus verbindet Hsp70 und Hsp90, während die U-Box Domäne am C-Terminus eine E3 Ubiquitinligaseaktivität besitzt (Ballinger *et al.*,1999) (Abb. 5).

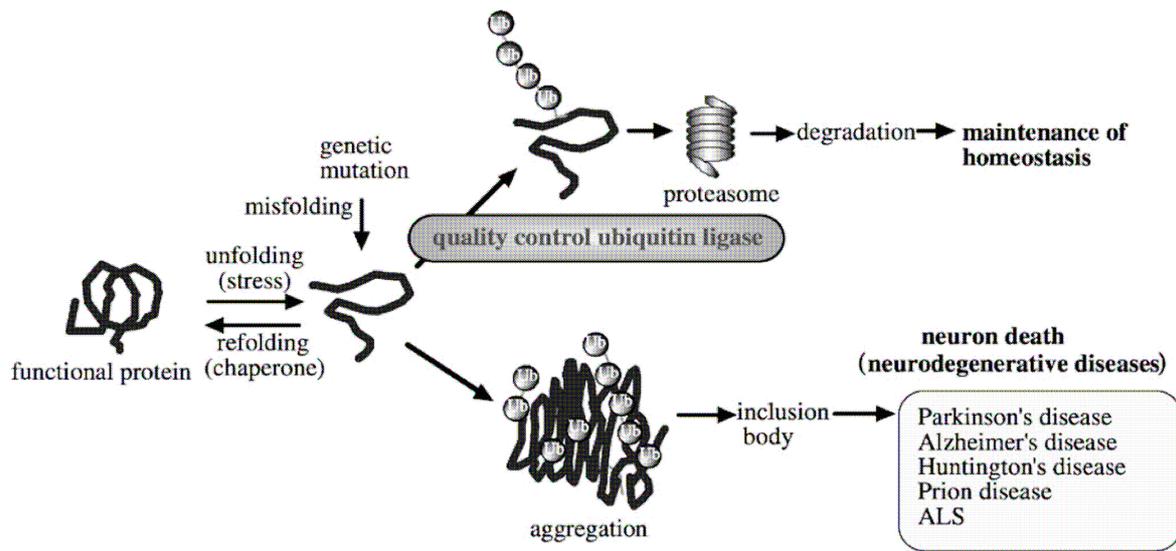


**Abb. 5: Die Assoziation von CHIP (carboxyl terminus of the Hsp70-interacting protein) mit molekularen Chaperonen.** CHIP bindet den C-Terminus von Hsp90 und Hsp70 über das TPR Motiv am N-Terminus. Viele andere Cochaperone sind ebenso mit Hsp90 und Hsp70 verknüpft (Murata *et al.*,2003).

Aufgrund der Fähigkeit von CHIP mit Hsp70 zu interagieren und als Ubiquitinligase zu fungieren, hat CHIP eine entscheidende Position bei der Kontrolle der Proteinqualität inne. Jedoch ist der Mechanismus, wie Hsp70 Substrate durch CHIP für die Ubiquitinierung ausgewählt werden, noch nicht vollständig verstanden (Rosser *et al.*,2007).

Zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ist das Gleichgewicht zwischen der Proteinfaltung und der Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems entscheidend. Falls das molekulare Chaperonsystem die Proteinfaltung eines Substratproteins in den nativen Zustand nicht erreicht, ist es notwendig, dass das Substratprotein für den Abbau bestimmt wird. Diesen Prozess bezeichnet man oft als Proteineselektierung (protein triage) (Wickner *et al.*,1999; Connell *et al.*,2001). Die Proteineselektierung muss strikt reguliert werden, da das Entweichen toxischer Proteine aus dem Proteinqualitätskontrollsystem (QC) oder eine zu hohe Aktivität des Proteinabbausystems zu einer Vielzahl von Erkrankungen beim Menschen führen (Welch,2004). CHIP stellt ein Cochaperon dar, welches als E3-Ubiquitinligase arbeitet und die Hsp70 Aktivität mit dem Ubiquitin-Proteasomsystem verknüpft. Die Bindung von CHIP an Hsp70 kann die Faltung von Zielproteinen des Hsp70 blockieren (Ballinger *et al.*,1999; Meacham *et al.*,2001; Younger *et al.*,2004) und ermöglicht gleichzeitig die U-box abhängige Ubiquitinierung von Hsp70-gebundenen Substraten (Jiang *et al.*,2001; Younger *et al.*,2004). Darüber hinaus scheint CHIP eine zentrale Rolle zu spielen, um die Zelle gegen Stress zu schützen (Dai *et al.*,2003; Kampinga *et al.*,2003; Yan *et al.*,2003). Zudem ist CHIP

verantwortlich für den Abbau krankheitsbedingter Proteine einschließlich dem Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) (Meacham *et al.*,2001), p53 (Esser *et al.*,2005), Huntingtin (Jana *et al.*,2005), Ataxin-3 (Jana *et al.*,2005), Tau-Protein (Petrucci *et al.*,2004; Shimura *et al.*,2004; Sahara *et al.*,2005), und  $\alpha$ -Synuclein (Shin *et al.*,2005) (Abb. 6).



**Abb. 6: Konzept der Proteinqualitätskontrolle durch Ubiquitinligasen in der Pathogenese von neurodegenerativen Krankheiten.** Falsch gefaltete Proteine entstehen, wenn die Zelle verschiedensten Stressoren der Umwelt, wie Hitze und Oxidation, ausgesetzt ist. Bei Erbkrankheiten neigen genetisch mutierte Genprodukte zu fehlerhafter Faltung. Molekulare Chaperone falten diese fehlerhaften oder auch nicht gefalteten Proteine unter Beteiligung von Cochaperonen. Ist jedoch die Kapazität zur Korrektur der Faltung nicht ausreichend, dann gelangen diese Proteine in den proteasomalen Abbau. Ubiquitinligasen spielen eine entscheidende Rolle in der Proteinqualitätskontrolle. Proteine, die einer Korrektur der Faltung und dem Abbau entgehen, können Aggregate bilden und möglicherweise toxische Einschlüsse bzw. Einschlusskörper entstehen (Murata *et al.*,2003).

CHIP stellt eine therapeutisch interessante E3-Ligase dar, da sie die Akkumulation abnormaler Proteine verhindern kann (Murata *et al.*,2003).

Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, dass die Fähigkeit von CHIP als Chaperon zu wirken, sehr wichtig ist sowohl beim Ablauf der Proteinselektionierung als auch zum Schutz gegen Zellstress.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere und -haltung

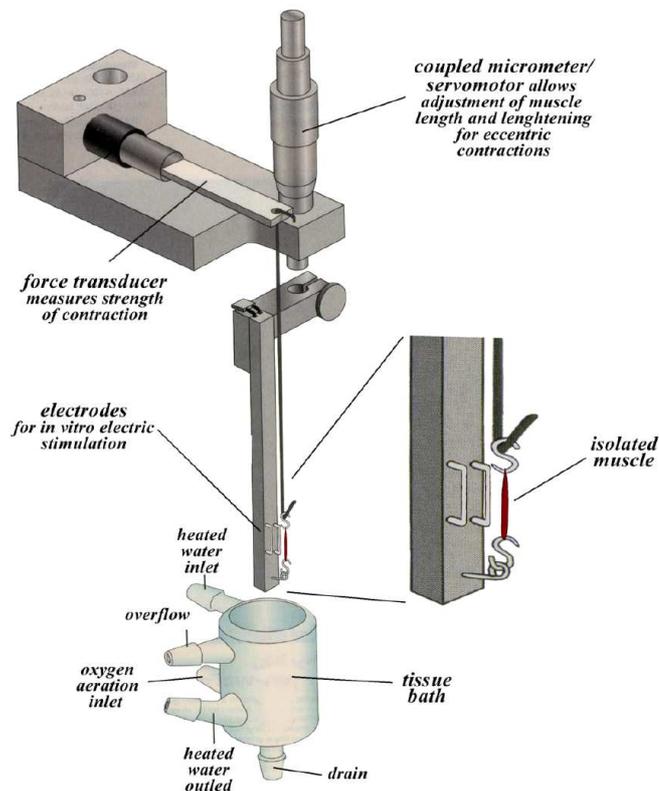
Die für die vorliegende Arbeit verwendeten *mdx*-Mäuse, wurden von Charles River Laboratories (Luxemburg, Belgien) und die Wildtyp-Kontrollmäuse C57BL/10ScSnOlaHsd (BL10) von Harlan Laboratories (Hilcrest, UK) bezogen. Die *chip*<sup>+/-</sup>-Mäuse wurden von Cam Patterson, Ph.D. (University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA) zur Verfügung gestellt. Alle Experimente wurden entsprechend den Bestimmungen der zuständigen Behörde, Regierung von Oberbayern, durchgeführt (55.2-1-54-2531-131-06).

Alle Mäuse wurden unter identischen Bedingungen in IVC-Racks (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland) gehalten. Ihre Unterbringung erfolgte in Makrolonkäfigen des EuroStandard Typs II long (Tecniplast Deutschland GmbH). Für die Zucht wurden getönte Käfige verwendet (Tecniplast Deutschland GmbH). Die Haltung erfolgte in Gruppengrößen von 1-5 Tieren auf Labortiereinstreu aus Weichholzgranulat (Lignocel Typ: FS 14, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) mit darauf liegendem Gitterrost unter gleichbleibenden klimatischen Bedingungen (durchschnittlich 23°C Raumtemperatur, 45% relative Luftfeuchtigkeit, Lichtprogramm mit 12 Stunden dauernder Tagphase). Die Käfige wurden zusätzlich mit roten Zuchthäuschen aus Makrolon, Nagehölzern und Baumwoll-Nestels ausgestattet. Pelletiertes Alleinfuttermittel für Mäuse (Ssniff Spezialdiäten GmbH) sowie Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Zucht wurde mit strahlensterilisiertem, standardisiertem Zuchtfutter Typ:M Zucht (Ssniff Spezialdiäten GmbH) gefüttert. Die Nachkommen wurden im Alter von 3-4 Wochen abgesetzt, durch Ohrlochung markiert und nach Geschlechtern getrennt gehalten.

#### 3.2 Isometrische Muskelkraftmessung

Das Ziel einer Therapie der Muskeldystrophie besteht darin, die normale Muskelfunktion im Patienten wiederherzustellen. Um den Erfolg einer solchen Therapie nachzuweisen, eignet sich am besten die direkte Kraftmessung im Tiermodell. Die Kraftmessung am isolierten Mausmuskel wurde im Wesentlichen, wie bereits bei Petrof *et al.*, 1993 beschrieben, durchgeführt.

Die Mäuse wurden zunächst mit Ketamin (130 mg/kg) und Xylazin (20 mg/kg) narkotisiert. Der gesamte Muskel wurde vorsichtig einschließlich der Sehnen entnommen. Die Tiere wurden im Anschluss an die Messung noch im narkotisierten Zustand durch zervikale Dislokation schmerzlos getötet.



**Abb. 7: Aufbau der isometrischen Muskelkraftmessungsapparatur (angepasst nach World Precision Instruments, Berlin, Germany 1999).**

Die Muskelkraftmessungen wurden am isolierten *M. extensor digitorum longus* (EDL) durchgeführt. Dieser wird über eine der beiden Sehnen mit einem isometrischen Kraftwandler (Typ GRA FT-03; FMI, Seeheim, Deutschland) verbunden, welcher an einem Signalverstärker (Modell MIO-0501 DC-Brückenmeßverstärker; FMI, Seeheim, Deutschland) gekoppelt ist. Die Muskellänge wurde über einen Computer-kontrollierten Servomotor eingestellt. Die supramaximale Stimulierung mit Pulsen von einer Dauer von 1 ms erfolgte mittels zweier Platinelektroden eines elektrischen Stimulators (Modell ISG-8834/1-S; FMI, Seeheim, Deutschland), die an beiden Seiten des Muskels positioniert wurden. Während der Messung wurde der Muskel bei 30°C in einer Ringerlösung inkubiert, welche mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> versetzt wurde (Abb. 7).

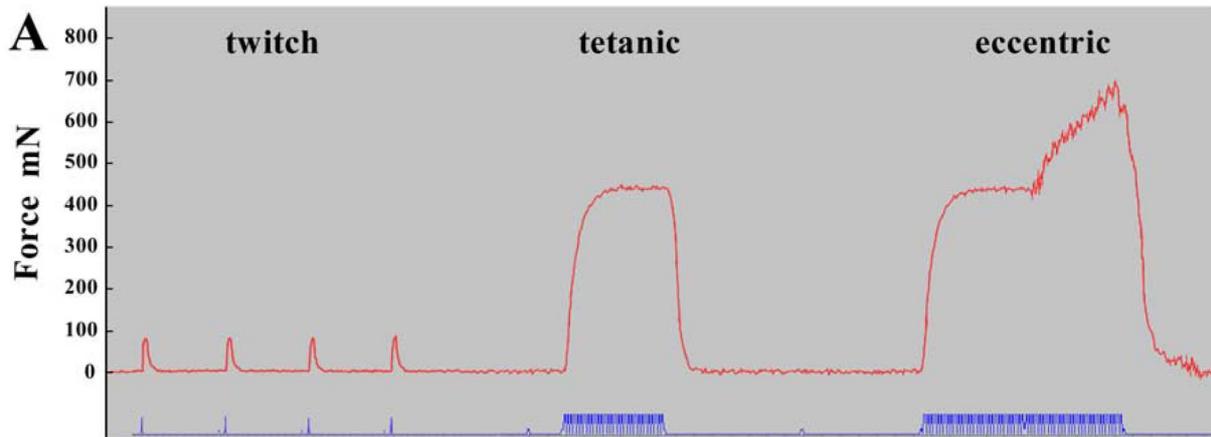


Abb. 8: Darstellung der unterschiedlichen Stimulierungsformen (Dunant,2003).

Die maximale Kraft der isometrischen Einzelkontraktion wird über die Stimulierung durch aufeinanderfolgende Einzelreize ermittelt (Abb. 8, links). Anschließend wird die maximale isometrische tetanische Kraft gemessen, indem der Muskel bei 125 Hz für 175 ms stimuliert wird (Abb. 8, Mitte). Die spezifische tetanische Kraft erhält man durch die Normalisierung der maximalen tetanischen Kraft mit der Muskelquerschnittsfläche (cross sectional area, CSA).

Es wird jedoch nicht nur die Maximalkraft des Muskels bestimmt, wichtig ist vor allem auch die Untersuchung der Muskelermüdung. Bei der Messung der Muskelermüdung wird der Muskel während der Stimulation verlängert. Dies führt zu Verletzungen der Muskelfasern (Abb. 8, rechts). Die Muskelfasern der *mdx* Mäuse erleiden dabei einen stärkeren Kraftverlust verglichen mit den Wildtyp-Mäusen (Head *et al.*,1992; Sacco *et al.*,1992).

Zur Ermittlung der Muskelermüdung wird der isolierte Muskel bei 125 Hz für 700 ms stimuliert, wobei der Muskel anfangs bei der optimalen Länge  $L_0$  ( $L_0$  stellt die Länge dar, bei welcher eine maximale Einzelkontraktion erreicht wird) für 200 ms belassen wird. Für die restlichen 500 ms wird der Muskel zusätzlich belastet, indem er um 10% von  $L_0$  gestreckt wird. Dabei werden fünf exzentrischen Kontraktionen gemessen, welche durch 2-minütige Erholungspausen für den Muskel bei der Länge  $L_0$  unterbrochen sind.

Die Messung dieser exzentrischen Kontraktion erfolgte im Wesentlichen nach Petrof *et al.* (Petrof *et al.*,1993).

### 3.3 Muskelhistologische Untersuchung

#### 3.3.1 Histochemie und Immunohistochemie

Für die immunhistologische Untersuchung wurden 8 µm dicke seriell geschnittene Muskelquerschnitte gefärbt. Die Schnitte wurden zunächst mit Antikörpern gegen die Myosin-Schwerekette vom langsamen Typ und nachfolgend mit Antikörpern gegen die Myosin-Schwerekette vom schnellen Typ in einer MHC-Doppelfärbung behandelt. Die Antikörper gegen langsames und schnelles Myosin (NovoCastra, Newcastle upon Tyne, UK) wurden 1:100 verdünnt. Jeder Inkubation der Schnitte mit einem der beiden primären Antikörper folgte die Färbung mit dem sekundären Antikörper anti-Maus Ig Meerrettich-Peroxidase (DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung 1:100. Die verschiedenen Myosin-Schwerekette Fasertypen wurden mit verschiedenen Substraten wie 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) bzw. dem kommerziellen Substrat Vector SG Visualization Solution (Vector Laboratories, Burlingame, USA) sichtbar gemacht. Dabei zeigen Fasern des langsamen Typs eine braune Färbung und die Fasern des schnellen Typs eine blaue Färbung. Im Anschluss an die erste Farbreaktion wurden die Schnitte mit fötalem Kälberserum (FCS) geblockt, bevor der zweite primäre Antikörper appliziert wurde. Die Fasergrenzen wurden mit 100 ng/ml Weizenkeimagglutinin (wheat germ agglutinin, WGA) konjugiertem Alexa Fluor 488 Farbstoff (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) gefärbt. Die Kerne wurden mit 10 ng/ml Hoechst 33258 (Sigma) sichtbar gemacht. Für lichtmikroskopische Aufnahmen wurde eine zweite Färbung der Kerne mit Carazzis's Hämatoxylin durchgeführt. Schließlich wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium (DAKO) eingedeckt.

#### 3.3.2 Automatisierte quantitative Analyse verschiedener histologischer Parameter

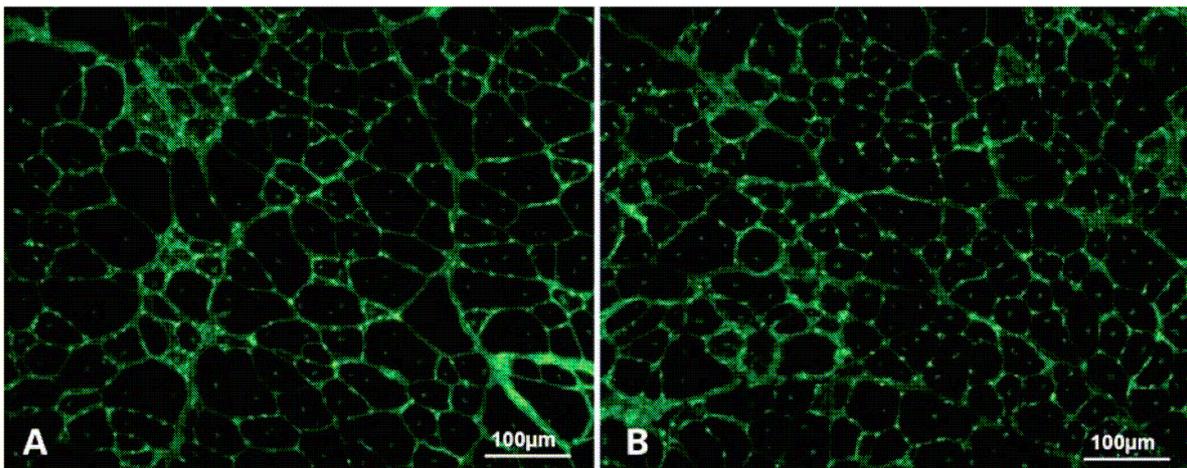
Um eine verlässliche und empfindliche Methode zur quantitativen Analyse der Muskelfaserhistologie zu erreichen, wurde in Kooperation mit der Firma S.CO LifeScience GmbH, München ein spezielles Modul „MyoScan“ des web-basierten Bildanalyseprogrammes S.CORE zur automatisierten Analyse der Muskelhistologie entwickelt.

Für die automatische quantitative Analyse der Muskelhistologie wurden drei verschiedene Aufnahmen des zu untersuchenden Bereiches des Muskelschnittes gemacht: 1. WGA (wheat germ agglutinin)-Färbung, die der Markierung der Fasergrenzen dient (Abb. 9), 2. Hoechst 33258-Färbung zur Anfärbung der Zellkerne und 3. MHC-Doppelfärbung zur Differenzierung

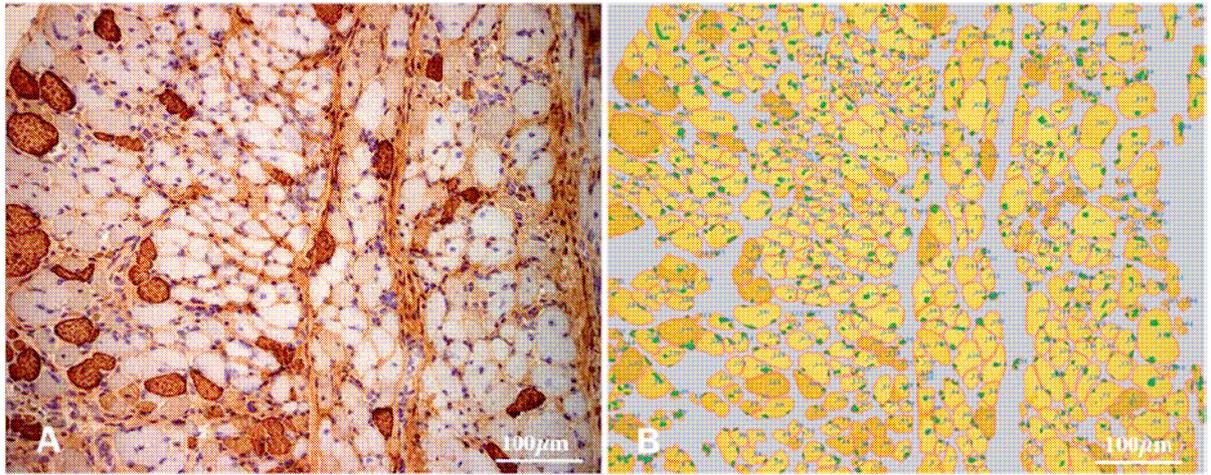
der Fasertypen (langsamer Myosin-Typ bzw. schneller Myosin-Typ). Im ersten Bild werden alle Membranstrukturen vom Hintergrund getrennt. Dadurch erhält man eine Maske für jede individuelle Muskelfaser, über die man den minimalen Feret's Durchmesser bestimmen kann. Der minimale Feret's Durchmesser ist definiert als der geringst mögliche Abstand zwischen zwei parallelen Tangenten eines Objekts (z.B. Muskelfaser) (Briguet *et al.*,2004). Diese Maske wird zum einen mit der Hoechst 33258-Aufnahme überlagert, um die Anzahl der innerhalb der Faser befindlichen Zellkerne zu ermitteln. Zum anderen wird die Maske mit der MHC-Doppelfärbung überlagert, um die verschiedenen Fasertypen zu differenzieren (Abb. 9 und 10). Somit lassen sich aus dieser kombinierten Färbung vier verschiedene histologische Parameter ermitteln: der Anteil der Fasern mit zentralem Kern, die Fasertypverteilung, die Fasergröße (minimaler Feret's Durchmesser) und die Fasergrößenverteilung (Varianzkoeffizient). Bei Abgabe dieser Arbeit war die Entwicklung des Analysetools soweit fortgeschritten, dass der Anteil Fasern mit zentralem Kern, die Fasergröße und daraus die Fasergrößenverteilung und Varianzkoeffizient automatisch bestimmt werden konnten. Die Fasertypverteilung wurde von Hand an den vorliegenden MHC-doppelgefärbten Schnitten ausgewertet.

Der Varianzkoeffizient (VC) wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$VC = 1000 \times \frac{S.D. \text{ min Feret's Durchmesser}}{\text{mittlerer Feret's Durchmesser}}$$



**Abb. 9:** Repräsentative Weizenkeimagglutinin Färbung (WGA-Färbung) eines *M. tibialis anterior* (TA). (A und B) Alexa Fluor 488 konjugierte WGA-Färbung eines TA Muskels einer mit Kontrollfutter behandelten (A) und einer mit 5x (Methazolamid) MTZ behandelten (B) *mdx*-Maus. WGA bindet *N*-Acetylglucosamin- und Sialinsäure-Reste an der Muskelfasermembran.



**Abb. 10: Automatisierte quantitative Analyse der Muskelhistologie.** (A) Originalfoto einer lichtmikroskopischen Aufnahme der Myosin Heavy Chain (MHC)-Doppelfärbung eines Diaphragmaschnittes (DIA) einer *mdx*-Maus. Braune Fasern stellen den langsamen MHC-Fasertyp und blaue Fasern den schnellen Fasertyp dar. (B) Prozessiertes Foto desselben DIA-Schnittes aus (A). Die gelben Bereiche bezeichnen die vom Programm erkannten Fasern (langsamer Fasertyp: dunkelgelb, schneller Fasertyp: hellgelb). Jede identifizierte Faser wurde mit einer blauen Nummer versehen, um dessen ID festzulegen. Bindegewebe wird von dem Programm nicht erkannt (graue Bereiche). Erkannte Zellkerne werden durch grüne Punkte markiert.

Die Abbildungen 9A und B zeigen die Alexa 488 konjugierte WGA-Färbung von Muskelschnitten von 5x MTZ-behandelten *mdx*-Mäusen und Kontrollen. Die WGA-Färbung erlaubt eine klare Darstellung der Faserbegrenzungen, worüber der minimale Feret's Durchmesser bestimmt werden kann. Die Myosin Heavy Chain (MHC)-Doppelfärbung (Abb. 10A) stellt Informationen über die Fasertypverteilung, den Anteil an Fasern mit zentral lokalisiertem Zellkern und über die Fasergrößen zur Verfügung.

### 3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der SPSS Statistics 17.0 Software (SPSS GmbH Software, München, Deutschland). Alle Datensätze wurden in einem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Diejenigen Datensätze, welche eine Normalverteilung aufwiesen wurden in einem Student's t-Test weiter analysiert. An den übrigen Datensätzen wurde ein Mann-Whitney-Test durchgeführt.

### 3.5 Präklinische Validierung zweier Carboanhydrase-Inhibitoren in der *mdx*-Maus

Die therapeutische Wirksamkeit der Carboanhydraseinhibitoren (CA) Methazolamid (MTZ) und Dichlorophenamid (DCPM) sollte in einer Langzeituntersuchung in der *mdx*-Maus, dem Mausmodell der DMD, validiert werden. Dazu wurde im Anschluss an die Behandlung der Mäuse mit den CA-Inhibitoren der *M. tibialis anterior* und das Diaphragma histologisch untersucht und darüber hinaus eine isometrische Muskelkraftmessung des *M. extensor digitorum longus* (EDL) durchgeführt.

#### 3.5.1 Behandlung der *mdx*-Mäuse mit den Carboanhydraseinhibitoren

Männliche *mdx*-Mäuse (70 Tage alt) wurden 120 Tage lang mit Futter gefüttert, welches DCPM bzw. MTZ enthielt oder mit Kontrollfutter mit ansonsten identischer Zusammensetzung. Die Behandlung mit DCPM erfolgte mit einer geringen Dosis (15 mg/kg/Tag) oder einer hohen Dosis (60 mg/kg/Tag). Diese Mengen stellen die 5x bzw. 20x der durchschnittlichen Dosierung beim Menschen dar. Bei der Behandlung mit MTZ stellte sich die 20x Dosierung (86 mg/kg/Tag) als lethal heraus, weswegen nur eine niedrigere 1x Dosierung (4,3 mg/kg/Tag) und als hohe Dosis die 5x Dosierung (21,5 mg/kg/Tag) verabreicht wurden. Die Medikamentenkonzentrationen im Futter wurden auf der Grundlage berechnet, dass *mdx*-Mäuse ~15% des Körpergewichts pro Tag fressen (Laurent Ségalat, persönliche Mitteilung). Zum Ende der Behandlung besaßen alle Mäuse ein ähnliches Gewicht, was darauf hinweist, dass die Futteraufnahme vergleichbar war.

#### 3.5.2 Histologische Untersuchungen und isometrische Muskelkraftmessung

##### 3.5.2.1 Histochemie und Immunohistochemie

Die histochemische und immunhistochemische Färbung wurde durchgeführt wie unter Punkt 3.3.1 beschrieben. Eine repräsentative Abbildung einer Wheat germ agglutinin-Färbung (WGA-Färbung) eines *tibialis anterior* (TA) Muskels der MTZ Gruppe wird in Abb. 9 gezeigt.

##### 3.5.2.2 Automatisierte histologische Analyse der Muskelschnitte

Zur histologischen Analyse der Muskelschnitte wurden zwei geeignete Parameter ausgewählt. Der minimale Feret's Durchmesser der Fasern und der Anteil der Fasern mit zentral

lokalisierten bzw. internalisierten Zellkernen (hinweisend auf Muskelregeneration) wurden bestimmt (Briguet *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurden etwa 2000-3000 Fasern des *M. tibialis anterior* (TA) bzw. Diaphragma (DIA) Muskels von je  $n \geq 5$  Tieren der 5x MTZ-Gruppe und zugehöriger Kontrollgruppe bezüglich beider Parameter ausgewertet. Eine automatisierte histologische Analyse konnte nur für die 5x MTZ-Gruppe und die entsprechende Kontrollgruppe durchgeführt werden, da die Qualität der Muskeln aus der DCPM-Gruppe, aufgrund von Gefrierartefakten, nicht ausreichend war und somit die Analyse nicht möglich war.

### 3.5.2.3 Isometrische Muskelkraftmessung

Die isometrische Muskelkraftmessung erfolgte entsprechend der Angaben unter Punkt 3.2.

## 3.6 Entwicklung eines neuen Mausmodells (*dys<sup>-/-</sup>/chip<sup>-/-</sup>* bzw. *dys<sup>-y</sup>/chip<sup>-/-</sup>*)

### 3.6.1 Zucht und Genotypisierung

Ziel war es im Rahmen der Doktorarbeit ein neues Mausmodell einer Knockoutmutante (*dys<sup>-/-</sup>/chip<sup>-/-</sup>* bzw. *dys<sup>-y</sup>/chip<sup>-/-</sup>*) zu entwickeln. Es wurden zwei Herangehensweisen verfolgt, zum einen der Ansatz einer Auszucht und zum anderen der Ansatz einer Inzucht. Hier ist zu vermerken, dass in dieser Arbeit keine Aus- bzw. Inzucht per Definition erzeugt wurde, da dazu eine sehr viel höhere Anzahl an Zuchttieren und Generationen nötig gewesen wäre. Es war jedoch auch nicht das Ziel dieser Arbeit eine stabile Linie zu etablieren, da auch die Ressourcen für die Erhaltung einer solchen Linie nicht vorhanden waren. Vielmehr war es das Ziel, eine statistisch ausreichende Anzahl an Versuchstieren für die geplanten Experimente zu erzeugen. Dennoch werden im Weiteren die Begriffe Auszucht und Inzucht verwendet.

Generell stellte die Parentalgeneration P0 beider Zuchtansätze eine Hybridzucht zweier Inzuchtlinien (*mdx* bzw. *chip<sup>+/-</sup>*) dar. Dabei besteht für beide Loci keine chromosomale Kopplung. Deshalb und aufgrund der Heterozygotie eines der beiden Elterntiere waren in der F1-Generation noch keine homozygoten Doppelmutanten zu erwarten. Nach den Mendelschen Regeln entstehen, aber bzgl. des *chip*-Lokus bzw. des *dys*-Lokus 50% heterozygote Mäuse abhängig davon, aus welcher Inzuchtlinie das männliche oder weibliche Elterntier stammt. Für den Fall, dass das Männchen aus der *chip<sup>+/-</sup>*-Inzuchtlinie stammt, sind 25% der männlichen Nachkommen mit dem Genotyp *dys<sup>-y</sup>/chip<sup>+/-</sup>* und 25% der weiblichen Nachkommen mit dem Genotyp *dys<sup>+/-</sup>/chip<sup>+/-</sup>* zu erwarten. Stammt dagegen das Weibchen aus

der *chip*<sup>+/-</sup>-Inzuchtlinie, so besitzen 25% der männlichen Nachkommen den Genotyp *dys*<sup>+y</sup>/*chip*<sup>+/-</sup> und 25% der weiblichen Nachkommen den Genotyp *dys*<sup>+/-</sup>/*chip*<sup>+/-</sup>. In dieser Arbeit wurde nach dem ersten Zuchtschema vorgegangen. Die so resultierenden, auf dem *chip*-Lokus heterozygoten Tiere der F1-Generation, wurden zunächst weiterverpaart, wobei die Zuchtiere nicht immer aus einem Wurf stammten. Die weitere Zucht mit den Jungtieren aus der F2-Generation erfolgte in den zwei verschiedenen Zuchtansätzen. Zunächst wurde der Ansatz einer Auszucht verfolgt, da dieser einfacher und schneller durchzuführen ist. Im späteren Verlauf wurde dann eine Inzuchtstrategie verfolgt. In beiden Zuchtansätzen sollte der Geschwistervergleich eine Vergleichbarkeit und aussagekräftige Ergebnisse sicherstellen, da sich hier der genetische Pool jeweils heterogener darstellt als in einer Inzucht im engeren Sinn.

Im Weiteren wurden für die Auszuchtlinie F2-Nachkommen aus verschiedenen Würfen und Zuchtpaaren weiter verpaart, während für die Inzuchtlinie nur Geschwister der F2-Generation verpaart wurden. Die Verpaarung der Auszuchtlinie wurde bis zur Generation F4 fortgesetzt, wohingegen die Verpaarung der Inzuchtlinie bis zur Generation F3 stattfand.

Die erhaltenen Nachkommen wurden für beide Loci (*dys* bzw. *chip*) mittels PCR der genomischen DNA aus Schwanzbiopsien mit spezifischen Primern genotypisiert. Die genomische DNA wurde unmittelbar nach Entnahme einer Schwanzprobe gewonnen. Etwa 0,3 cm große Schwanzproben wurden zunächst über Nacht bei 56°C in 400 µl Tail-Buffer (1% SDS, 10 mM Tris pH 7,5, 50 mM EDTA, 150 mM NaCl) und 24 µl Protease K (20 mg/ml) verdaut. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Isopropanol-Fällung der genomischen DNA. Das erhaltene Pellet wurde in 20 µl 5 mM Tris/HCl, pH 8,5 unter Schütteln 1 h bei 50°C gelöst. Für die PCR zur Genotypisierung des *dys*-Lokus (*mdx*-PCR) wurde 1 µl der genomischen DNA eingesetzt, wohingegen für die PCR zur Genotypisierung des *chip*-Lokus (Chip-PCR) 200 ng genomische DNA verwendet wurde. Die spezifischen Primer-Sequenzen lauten wie folgt:

***mdx*-PCR** forward Primer: 5'-CTC TGC AAA GTT CTT TGA AAG AGT AA-3';

***mdx*-PCR** reverse Primer: 5'-GAA GTT TAT TCA TAT GTT CTT CTA GC-3';

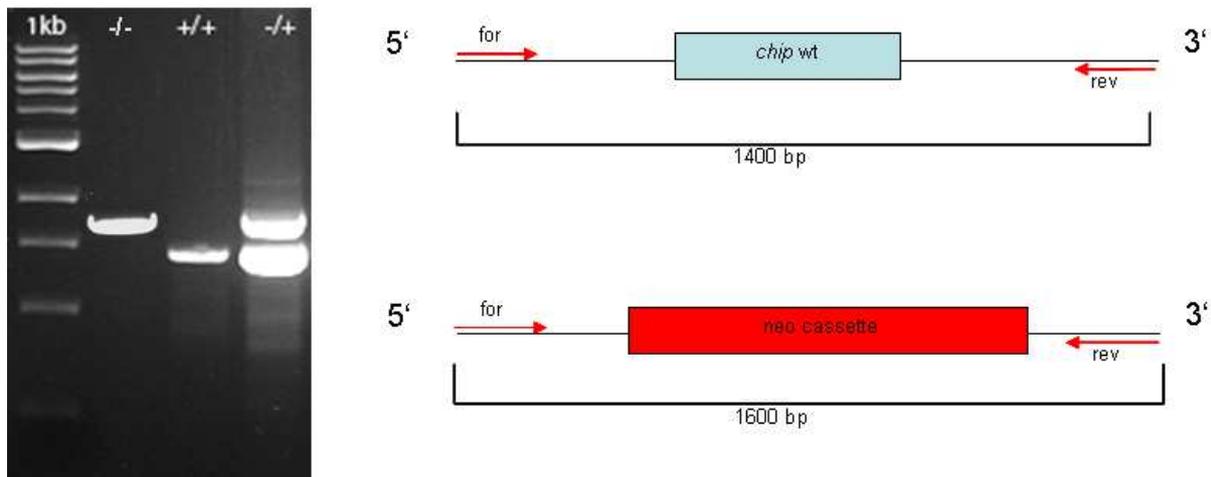
**Chip-PCR** forward Primer: 5'-TAG AGC TAA GGG AAC TGG CTC AAT-3';

**Chip-PCR** reverse Primer: 5'-TGA CAC TCC TCC AGT TCC CTG A-3';

Für die Chip-PCR wurde die AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die Denaturierung erfolgte für 1 min bei 94°C.

Anschließend wurden 35 Zyklen mit jeweils 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 60°C und 2 min bei 68°C durchlaufen. Die Elongation der PCR-Produkte fand für 5 min bei 68°C statt.

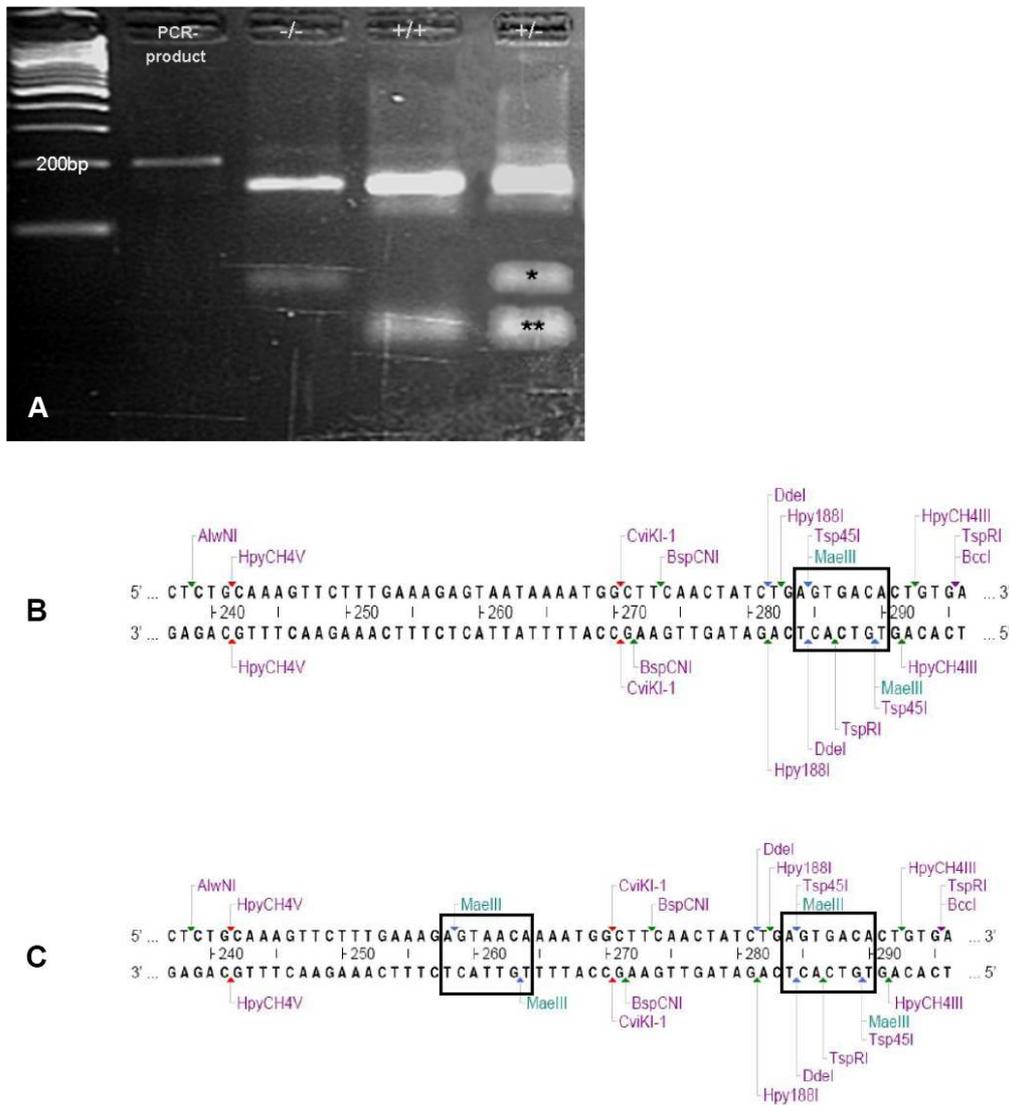
Die Chip-PCR liefert unmittelbar den Genotyp der Maus. Handelt es sich um ein *chip*<sup>+/-</sup>-Tier erhielt man zwei Banden (1,6 kb bzw. 1,4kb) auf dem Agarosegel. *chip*<sup>-/-</sup>-Tiere wiesen nur die Bande bei 1,6 kb auf, während *chip*<sup>+/+</sup>-Mäuse nur die Bande bei 1,4 kb zeigten (Abb. 11).



**Abb. 11: Genotypisierung der Nachkommen aus der Chip x *mdx* Kreuzung.** PCR Analyse des *chip*-Knockout. PCR einer *chip*<sup>-/-</sup>-Maus zeigte eine Bande bei 1,6 kb. Mäuse, die einen Wildtyp-Genotyp auf dem *chip*-Lokus besaßen (*chip*<sup>+/+</sup>), wiesen eine Bande bei 1,4 kb auf und heterozygote *chip*-Knockout-Mäuse (*chip*<sup>+/-</sup>) lieferten beide Banden.

Bei der *mdx*-PCR mit Taq-Polymerase erfolgte die Denaturierung für 1 min bei 94°C. Anschließend wurden 35 Zyklen mit jeweils 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 55°C und 20 sec bei 72°C durchlaufen und die Endelongation dauerte 2 min bei 72°C. Im Falle der *mdx*-PCR lieferte die PCR nicht direkt den Genotyp der Maus, da es sich um ein Mismatch Primerpaar handelte, das sowohl die Wildtyp- als auch die mutierte Sequenz erkennt. Für jedes Tier ergibt sich ein PCR-Produkt der Länge 200 bp. Die Punktmutation in Exon 23 C zu T führt nicht nur zu einem Stop-Codon, sondern entfernt auch eine Schnittstelle des Restriktionsenzym *MaeIII*. Das PCR-Produkt wird über den PCR Aufreinigungskit NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) von den restlichen Primern befreit. Anschließend erfolgt ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *MaeIII* (Roche, Mannheim, Deutschland), der bei *dys*<sup>-/-</sup>-Mäusen nur ein Restriktionsfragment mit 50 bp liefert. Tiere mit dem Genotyp *dys*<sup>+/-</sup> zeigen im Restriktionsverdau zwei Restriktionsfragmente (25 bp bzw. 50 bp). Durch den Restriktionsverdau des PCR-Produkts von *dys*<sup>+/+</sup>-Mäuse ergibt sich nur ein Fragment der Größe 25 bp (Abb. 12). Somit lässt erst der Restriktionsverdau des PCR-Produkts mit *MaeIII* eine eindeutige Aussage über den Genotyp zu. Männliche Tiere zeigen entweder das 25 bp

Restriktionsfragment oder das 50 bp Fragment aufgrund der zwei möglichen Genotypen  $dys^{+/y}$  und  $dys^{-/y}$ .



**Abb. 12: Genotypisierung des *dys*-Lokus.** (A) Genotypisierung der Nachkommen aus der Chip x *mdx* Kreuzung. *MaeIII* Restriktionsverdau des PCR-Produkts. Eine Maus mit homozygoter Punktmutation ( $dys^{-/y}$  bzw.  $dys^{-/y}$ ) im Dystrophingen zeigte nur ein Restriktionsfragment bei 50 bp (\*) nach dem Verdau mit *MaeIII*. Mäuse, die einen Wildtyp-Genotyp auf dem *dys*-Lokus besaßen ( $dys^{+/+}$ ), wiesen ein Fragment bei 25 bp (\*\*) auf und auf dem *dys*-Lokus heterozygote Mäuse ( $dys^{+/-}$ ) lieferten beide Fragmente. Verlust der Restriktionsstelle für *MaeIII* (NGTNACN) durch die Punktmutation C→T. (B) Sequenz mit Restriktionsschnittstellen der entsprechenden Stelle auf dem Dystrophingens mit der Punktmutation im Exon 23 auf dem X-Chromosom an Position 3185 (*mdx*-Genotyp). (C) Sequenz mit Restriktionsschnittstellen der entsprechenden Stelle auf dem Dystrophingen ohne Punktmutation (Wildtyp).

### 3.6.2 Charakterisierung der Inzucht- und Auszuchtlinie

Die Auszuchtlinie lieferte keine  $dys^{-/-}/chip^{-/-}$  bzw.  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ -Tiere. Gruppen von 3, 6 und 12 Monate alten  $dys^{-y}/chip^{+/+}$  und  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ -Mäuse wurden mittels isometrischer Muskelkraftmessung und histologisch untersucht. Zudem wurde hier die Gewichtsentwicklung männlicher Tiere über einen Zeitraum von 12 Monaten dokumentiert. Zum Vergleich wurde die Gewichtsentwicklung auch in C57BL/10-Mäusen und *mdx*-Mäusen betrachtet.

In der Inzuchtlinie konnten die *M. extensor digitorum longus* der wenigen überlebenden ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Tiere mit drei Monaten in der isometrischen Muskelkraftmessung untersucht werden. Gewebeproben wurden histologisch und proteinbiochemisch mittels Western Blot-Analyse untersucht (siehe 3.6.2.2 und 3.6.2.1). So wurde dort die relative Expression der Proteine  $\alpha$ -Dystroglykan, Utrophin,  $\alpha$ -Aktinin-2, Calsarcin-2, Myogenin und p53 analysiert. Zusätzlich zu dem Anteil der Fasern mit zentralem Zellkern, der Fasergrößenverteilung, dem Varianzkoeffizienten der Fasergrößen und dem Fibrosegrad, wurden die Fasertypenzusammensetzung und das oxidative Potential der Myofasern charakterisiert.

#### 3.6.2.1 Proteinextraktion aus Muskelgewebe und Western Blot Analyse

Der Einfluss der CHIP-Heterozygotie/CHIP-Homozygotie wurde auch mittels Western Blot untersucht. Dazu wurde das Gesamtprotein aus Muskelgewebe extrahiert. Das Gewebe wurde im Mörser unter flüssigem Stickstoff zu einem Pulver zerrieben und anschließend in einem Homogenisierungspuffer [10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1% SDS, Proteaseinhibitor Cocktail (Complete Mini, Roche)] lysiert. Daraufhin wurde die Probe dreimal 5 Minuten lang bei 95°C erhitzt und jeweils dazwischen homogenisiert. Nach Zentrifugation (15 min, 14 000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und der Gesamtproteingehalt der Probe mittels BCA-Assay (Pierce, Rockford, USA) ermittelt. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Die Immunodetektion erfolgte für 10-25  $\mu$ g Proteinextrakt pro Probe. Die Proteine wurden über ein denaturierendes 12% bzw. 5,5% Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membranen wurden in 5% Magermilch in TBS-T-Puffer [8% NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,6) und 0,1% Tween-20] 1 h geblockt. Die Blots wurden über Nacht bei 4°C mit Verdünnungen folgender primärer Antikörper in TBS-T/5% Magermilch inkubiert: anti- $\alpha$ -Aktinin-2 (1:4000, Sigma-Aldrich), anti- $\alpha$ -Dystroglykan (1:500, Upstate Biotechnology, Inc., Massachusetts, USA),

anti-Utrophin (1:50, NovoCastra), anti-Myogenin (1:600, Abcam, Cambridge, UK), anti-Calsarcin-2/Myozenin-1 (1:1000, Abcam) und anti-p53 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg).

Anti-CHIP (Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA) wurde 1:1000 in TBS-T/5% BSA und anti- $\beta$ -Aktin (Santa Cruz Biotechnology) 1:200 in TBS-T verdünnt und jeweils auch über Nacht bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden die Blots in TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen und mit einem entsprechenden isotypspezifischen Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Cell Signalling Technology) in einer Verdünnung von 1:2000-5000 in 5% Magermilchpulver in TBS-T 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die immunreaktiven Banden wurden mittels Chemilumineszenz (ECL Kit, Amersham, Indianapolis, IN, USA) sichtbar gemacht. Jede Gewebeprobe wurde für jedes Zielprotein in einer Dreifachbestimmung analysiert. Die Bandenintensität wurde mit Hilfe der Software ImageJ (National Institutes of Health, USA) ermittelt (Schneider *et al.*, 2012). Für die Quantifizierung der relativen Expression von CHIP,  $\alpha$ -Aktinin-2, Calsarcin-2, Myogenin und p53 diente die Bandenintensität von anti- $\beta$ -Aktin als interner Standard zur Normalisierung der aufgetragenen Proteinmenge. Dagegen wurden zur Quantifizierung der Proteinexpression von  $\alpha$ -Dystroglykan und Utrophin eine prominente Bande der Ponceau S-Färbung zur Normalisierung der Menge an geladenem Protein verwendet.

#### 3.6.2.2 Histochemische und Immunhistochemische Untersuchungen

Die Wirksamkeit des hier verfolgten Therapieansatzes zur Reduktion des muskelspezifischen Proteinabbaus sollte auch mittels histochemischer und immunhistologischer Untersuchungen überprüft werden. Dabei sollten verschiedene pathologisch relevante Parameter bestimmt werden. Dazu zählt der Anteil der Fasern mit zentral lokalisiertem Zellkern, der Varianzkoeffizient der Fasergrößen, ermittelt über den minimalen Feret's Durchmesser, die Fasergrößenverteilung, die Fasertypenzusammensetzung, das oxidative Potential der Muskelfasern und der Anteil an fibrotischem Muskelgewebe.

Die drei erstgenannten Parameter wurden über die unter Punkt 3.3.1 beschriebene immunhistochemische Färbung zugänglich und über das Modul „MyoScan“ der Firma S.CO Lifescience GmbH analysiert, welches unter Punkt 3.3.2 beschrieben wurde.

Die Fasertypenzusammensetzung wurde mit Hilfe der dort beschriebenen MHC-Doppelfärbung sichtbar gemacht, die von Hand ausgewertet wurde.

Um zwischen oxidativen und weniger oxidativen Muskelfasern zu unterscheiden, wurde eine Succinat-Dehydrogenase (SDH)-Färbung im *M. tibialis anterior* und im Diaphragma durchgeführt. Der Anteil an fibrotischem Muskelgewebe wurde über die Van Gieson-Färbung sichtbar gemacht. Die Analyse des Anteils an fibrotischem Muskelgewebe wurde über das Analysetool der Firma Wimasis durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung dieses Analysetools erfolgt unter Punkt 3.6.2.3.

Sämtliche Bilder wurden mit dem Zeiss Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop und der Zeiss AxioCam HR Kamera mit 10- bzw. 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

### **Probengröße und Versuchstierzahl**

In der Inzuchtlinie konnten in den drei Monate alten (*dys<sup>-y</sup>/chip<sup>-/-</sup>*)-Mäusen mittels der MHC-Doppelfärbung etwa 700-4000 Fasern, in der partiellen Knockoutgruppe (*dys<sup>-y</sup>/chip<sup>+/-</sup>*) 2000-3500 Fasern und in der Kontrollgruppe (*dys<sup>-y</sup>/chip<sup>+/+</sup>*) 1500-5000 Fasern analysiert werden.

In der Van Gieson Färbung wurde der Anteil der fibrotischen Fläche an der Gesamtfläche des Muskelschnittes anhand von  $n \geq 4$  Tieren pro Gruppe der Inzuchtlinie ermittelt. Dabei wurde jeweils der komplette Querschnitt des DIA, Sol und des TA ausgewertet.

Für die SDH-Färbung wurde ebenfalls der komplette Querschnitt ausgewertet. Dabei handelte es sich jedoch nur um Material des *M. tibialis anterior* und Diaphragma von  $n \geq 4$  Tieren pro Gruppe der Inzuchtlinie.

### **Succinat Dehydrogenase (SDH)-Färbung**

Das Enzym Succinat Dehydrogenase ist an der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert und ist verantwortlich für die Oxidation von Succinat zu Fumarat im Zitratzyklus (Hagerhall,1997). Durch die Oxidation von Succinat wird NADH produziert. Succinat stellt somit das Substrat dar, während NADH das Reaktionsprodukt bildet. Der Elektronenakzeptor reagiert chemisch mit Nitroblautetrazolium (NBT), welches der Visualisierung der Reaktion dient. Proportional zur Anzahl der Mitochondrien und der SDH-Aktivität nimmt die Farbtiefe zu. Je mehr SDH (und damit Mitochondrien), desto intensiver ist die Färbung. Daher zeigt diese histochemische Färbung das relative oxidative Potential der Muskelfasern an.

Für die SDH-Färbung wurden die 8  $\mu\text{m}$  Muskelschnitte zunächst getrocknet und anschließend in einer frisch angesetzten Lösung aus 0,001 mM NBT (4-Nitroblautetrazoliumchlorid, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 100 mM Natrium-Succinat (Sigma-Aldrich), gelöst in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,2. Die Schnitte wurden bei 37°C für 2 h inkubiert, anschließend in Aqua dest. gespült und in Glyceringelatine (Sigma-Aldrich) eingedeckt.

Pro Muskelquerschnitt wurde die Anzahl der Fasern ausgezählt und je nach Intensität der SDH-Färbung zu drei Gruppen zusammengefasst. Fasern mit einer sehr intensiven Färbung wurden als Gruppe der stark oxidativen Fasern bezeichnet. War die Färbung weniger intensiv wurden die Fasern zu den mittelgradig oxidativen Fasern gerechnet. Die hellsten Fasern wurden als wenig oxidativ bezeichnet. Dabei wurden die Gruppen immer in Bezug auf die Gesamtintensität der Färbung des kompletten Muskelquerschnittes relativiert.

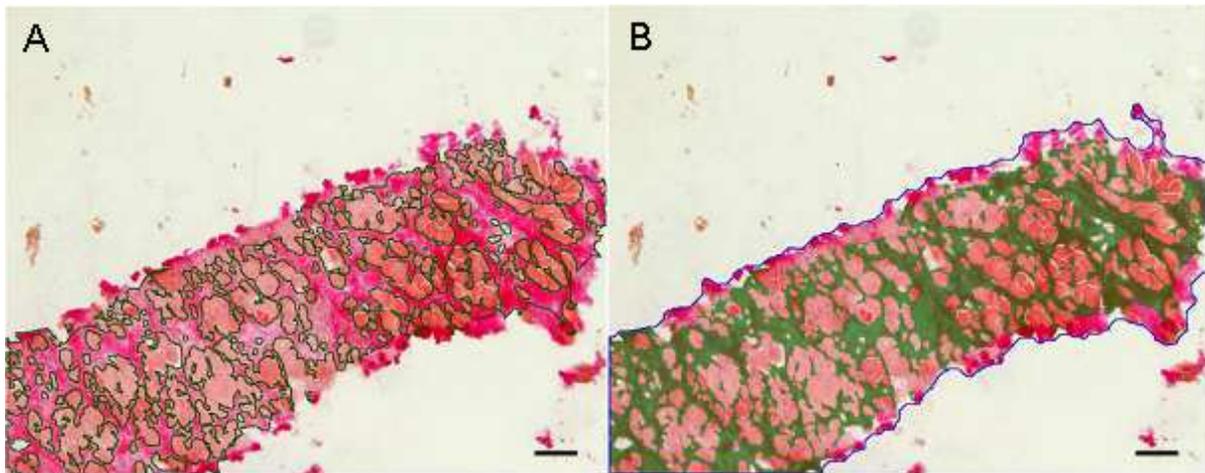
### **Van Gieson-Färbung**

8 µm dicke Schnitte wurden 5 min in Harris Hämatoxylin (Sigma-Aldrich) inkubiert und anschließend mindestens 5 min lang mit Leitungswasser gespült. Darauf folgte eine 5-minütige Inkubation in Pikrofuchsin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Die Schnitte wurden dann 2-3x mit entionisiertem Wasser gewaschen, zunächst in 100% EtOH 30 sec und anschließend für 2 min in Xylol entwässert und in einem Tropfen Eukitt (Fluka<sup>®</sup> Analytical, Seelze, Deutschland) eingedeckt.

#### 3.6.2.3 Automatisierte quantitative Analyse des Anteils an fibrotischem Muskelgewebe

Ein entsprechendes Analysetool wurde gemeinsam mit der Firma Wimasis, GmbH, München, Deutschland im *mdx*-Mausmodell mit C57BL/10 Wildtyp-Mäusen als Kontrollgruppe durchgeführt, um den Schwellenwert, ab dem ein Gewebe als fibrotisch identifiziert werden soll, zu definieren. Die Methode wurde auf Muskelschnitten von Diaphragma, *M. tibialis anterior* und *M. soleus* von 6 Monate alten männlichen Mäusen beider Gruppen angewandt, welche nach der unter Punkt 3.6.2.2. beschriebenen Van Gieson-Färbung gefärbt wurden.

Die Abbildung 13 zeigt den Muskelschnitt eines Diaphragmas einer *mdx*-Maus. Die bräunlichen Flächen stellen Muskelfasern dar, während es sich bei den rosa Bereichen um fibrotisches Gewebe handelt. Dieses fibrotische Gewebe wird nach der Analyse durch das Analysetool der Firma Wimasis grün eingefärbt dargestellt (Abb. 13 B). Gleichzeitig ermöglicht das Analysetool dem Anwender zu überprüfen, ob die richtigen Flächen detektiert wurden. Dazu wird ein Bild zur Verfügung gestellt, welches die als fibrotisch identifizierten Flächen zunächst grün umrandet anzeigt (Abb. 13 A). Die Ergebnisse werden als Verhältnis von fibrotischer Fläche zur Gesamtfläche des Muskelschnittes (Abb. 13 B, blau umrandet) angegeben. Die Randbereiche der Muskelschnitte wurden aus der Analyse herausgenommen, da es sich hierbei um Teile des Epimysium handelt und nicht zwingend um fibrotisches Gewebe. Alle Ergebnisse werden in einer Exceldatei zusammengefasst.



**Abb. 13: Automatisierte quantitative Analyse des Anteils an fibrotischem Muskelgewebe.** (A) Lichtmikroskopische Aufnahme eines Diaphragmaschnittes (DIA) einer *mdx*-Maus nach Van Gieson-Färbung. Bräunliche Bereiche stellen intakte Myofasern und rosa angefärbte Bereiche fibrotisches Gewebe dar. Grün umrandet sind diejenigen Bereiche dargestellt, die als fibrotisches Gewebe identifiziert wurden. Dadurch besteht für den Anwender die Möglichkeit, die korrekte Identifizierung zu überprüfen. (B) Die grünen Flächen zeigen das vom Analysetool detektierte fibrotische Gewebe an. Die blaue Umrandung umfasst die Gesamtfläche des analysierten Muskelschnittes. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

#### 3.6.2.4 Isometrische Muskelkraftmessung

Die isometrische Muskelkraftmessung des *M. extensor digitorum longus* (EDL) erfolgte entsprechend den Angaben unter Punkt 3.2.

Die Muskelkraftmessung der drei Monate alten ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Tiere und zugehöriger Kontrollgruppen [( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>In</sub>, *mdx*, C57BL/10], sowie der drei, sechs und zwölf Monate alten ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>Aus</sub>-Tiere und der Kontrollgruppen [( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>Aus</sub>, *mdx*, C57BL/10] sollten über die Wirksamkeit des Therapiekonzeptes Aufschluss geben. Die isometrische Muskelkraftmessung erfolgte in  $n \geq 4$  Mäusen je Gruppe.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Präklinische Validierung zweier Carboanhydrase-Inhibitoren in der *mdx*-Maus

#### 4.1.1 Histochemie und Immunhistologie

Dystrophe Muskeln weisen typischerweise eine höhere Variabilität des Muskelfaserdurchmessers im Vergleich zu normalen Muskeln auf. Der Varianzkoeffizient (VC) für den minimalen Feret's Durchmesser aller Muskelfasern eines Muskelquerschnittes stellt einen numerischen Wert für die Fasergrößenvariabilität dar (Briguet *et al.*,2004). Der minimale Feret's Durchmesser ist sehr widerstandsfähig gegenüber experimentellen Fehlern, wie z. B. der Orientierung des Schnittwinkels. Betrachtet man Muskeln von Wildtyp-Mäusen bezüglich eines zweiten histologischen Parameters, dem Anteil an Fasern mit zentral lokalisiertem Zellkern, zeigt sich, dass diese kaum zentral lokalisierte Zellkerne besitzen, während Muskeln von *mdx*-Mäusen einen durchschnittlichen Anteil von bis zu 66% Fasern mit zentralem Zellkern nach der ersten Degenerations- und Regenerationsphase bereits im Alter von etwa 7 Wochen besitzen (Briguet *et al.*,2004).

*Der Anteil an Fasern mit zentralem Zellkern nahm im TA, der mit 5x MTZ behandelten Tiere, signifikant ab, während sich der Varianzkoeffizient erhöhte*

Im Vergleich zur unbehandelten Gruppe waren keine offensichtlichen Unterschiede im histologischen Erscheinungsbild der 5x MTZ behandelten Muskeln ersichtlich (nicht gezeigt). Jedoch lieferte die automatisierte Analyse der Muskelschnitte aufschlussreiche Unterschiede. Die histologische Analyse des TA zeigt eine signifikante Abnahme des Anteils an Fasern mit zentral lokalisiertem Zellkern in der 5x MTZ behandelten Gruppe (MTZ:  $57,4 \pm 14,9\%$ ; Kontrolle:  $65,1 \pm 11,2\%$ ;  $p = 0,03$ ) (Abb. 14 A) und einen nicht-signifikant höheren Varianzkoeffizienten mit  $VC = 487 \pm 46$  in der Behandlungsgruppe verglichen mit  $VC = 448 \pm 22$  in der Kontrollgruppe ( $p > 0,05$ ).

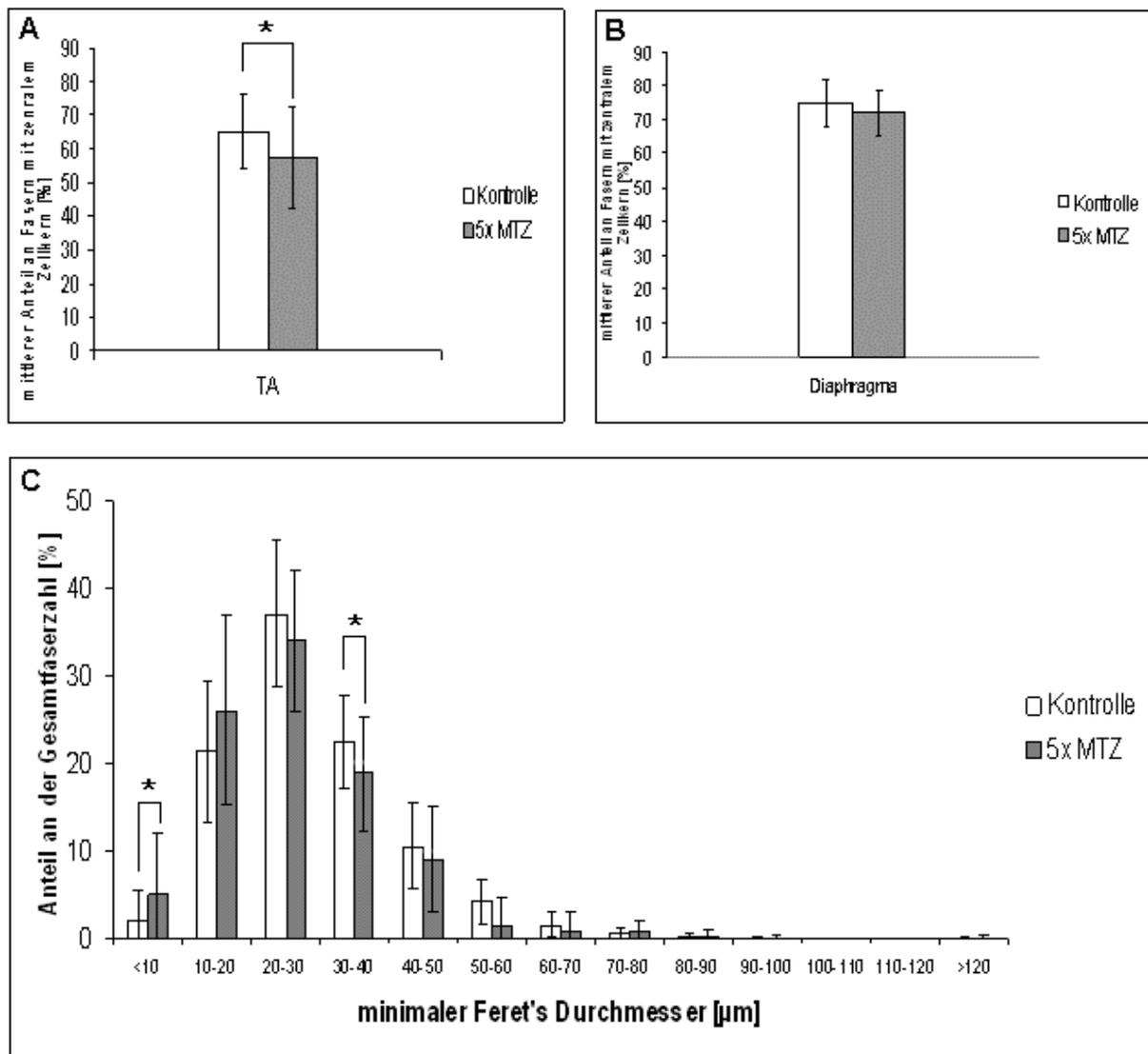
*Im TA der mit 5x MTZ-behandelten Gruppe wurde eine Verschiebung des minimalen Feret's Durchmessers beobachtet*

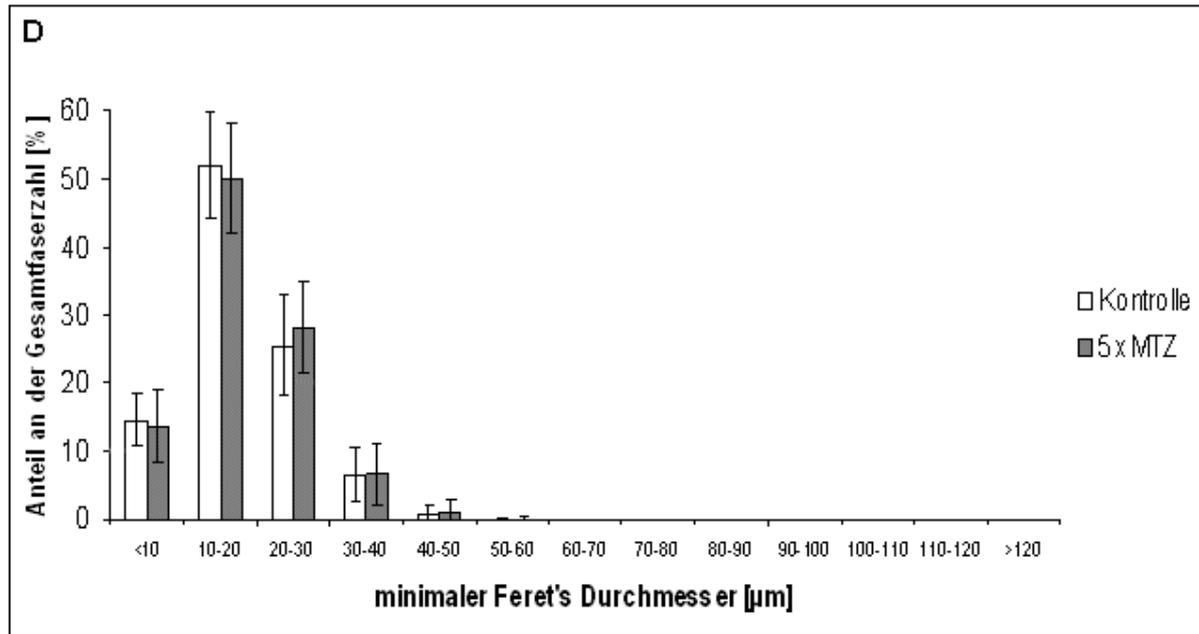
Gemäß des höheren VC in der 5x MTZ-behandelten Gruppe konnte eine Verschiebung des minimalen Feret's Durchmessers hin zu kleineren Faser mit Durchmessern bis zu  $20 \mu\text{m}$  (Abb. 14 C) in der 5x MTZ-behandelten Gruppe erkannt werden ( $p = 0,03$ ). Dagegen ist die

Anzahl der Fasern mit einem Durchmesser zwischen 30 und 40  $\mu\text{m}$  in der Kontrollgruppe höher ( $p = 0,02$ ) (Abb. 14 C).

*Der Anteil an Fasern mit zentralem Zellkern, der Varianzkoeffizient und die Fasergrößenverteilung unterschieden sich im DIA kaum zwischen behandelter Gruppe und Kontrollgruppe*

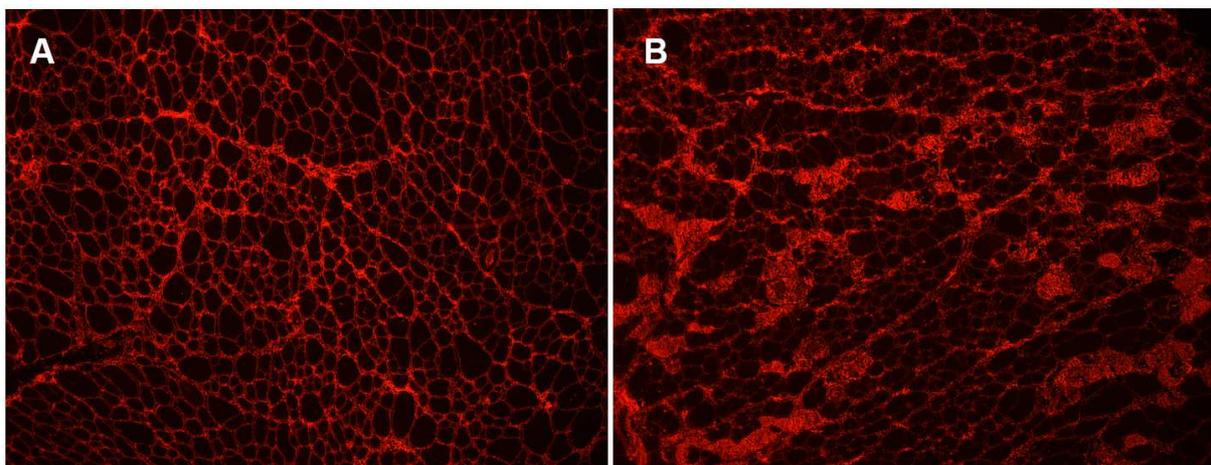
Im DIA wurde kein signifikanter Unterschied des Anteils an Fasern mit zentral lokalisierten Zellkernen zwischen der 5x MTZ behandelten Gruppe ( $72,1 \pm 6,7\%$ ) und der Kontrollgruppe beobachtet ( $75,1 \pm 7,0\%$ ;  $p = 0,085$ ) (Abb. 14 B). Der VC der Muskelfasergrößenverteilung im Diaphragma war mit  $VC = 425 \pm 36$  nur etwas niedriger in der Behandlungsgruppe verglichen mit  $VC = 439 \pm 10$  in der unbehandelten Gruppe ( $p > 0,05$ ). Darüber hinaus wiesen beide Gruppen sehr ähnliche Fasergrößenverteilungen auf (Abb. 14 D).





**Abb. 14: Quantitative Beurteilung der Muskelhistologie.** (A und B) Anteil an Fasern mit zentral lokalisierten Zellkernen im TA (A) und Diaphragma (B) der Kontrollgruppe versus 5x MTZ-behandelten *mdx*-Mäusen. (C und D) Fasergrößenverteilung im TA (C) und DIA (D) von Kontrollgruppe versus 5x MTZ-behandelten *mdx*-Mäusen. Es wurden etwa 3000 Fasern je Muskel analysiert. Die Messwerte sind wiedergegeben als mittlerer Anteil an Fasern mit zentral lokalisierten Zellkernen bzw. als mittlerer prozentualer Anteil des jeweiligen minimalen Feret's Durchmesser an der Gesamtfaserzahl  $\pm$  Standardabweichung; Abweichung von der Kontrolle mit \*  $p < 0.05$ .

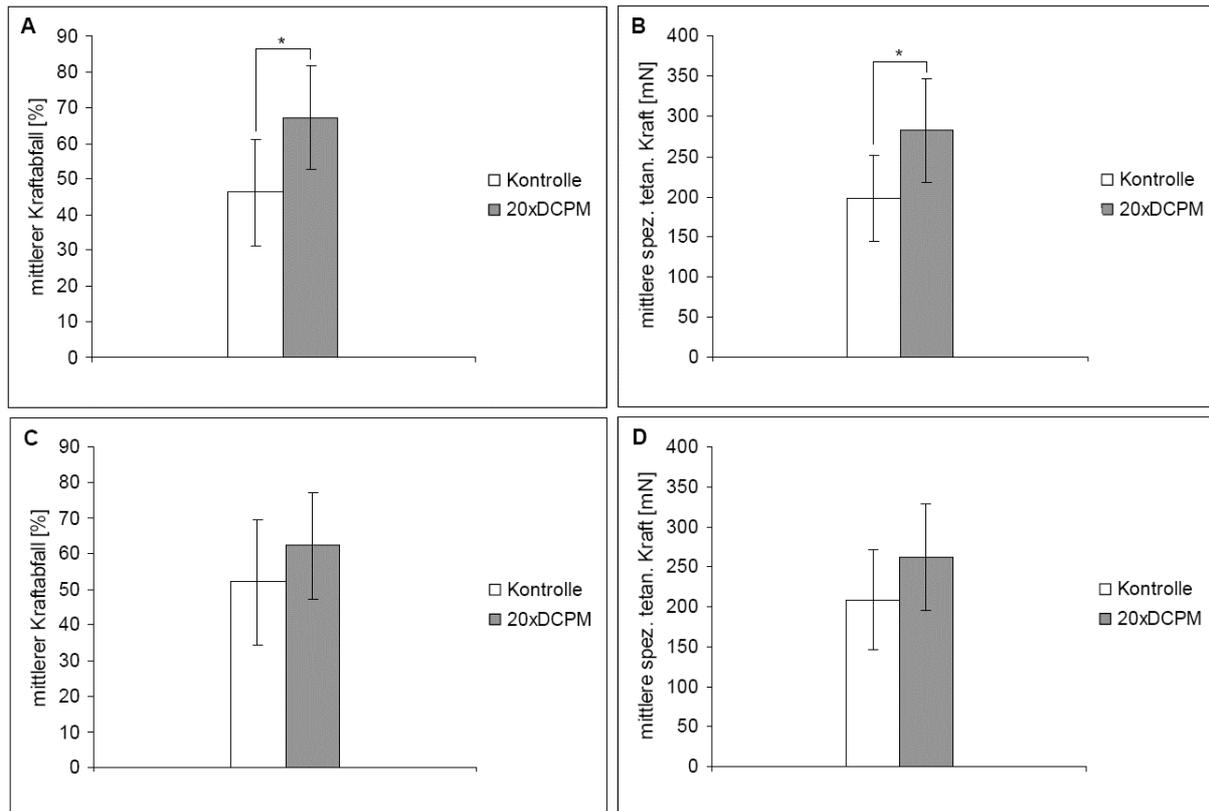
Die Immunfärbung regenerierender Fasern mittels eines Antikörpers gegen das Neuronale Zelladhäsions-Molekül (NCAM) zeigte qualitativ, dass in der 5x MTZ behandelten Gruppe mehr NCAM-positive Fasern auftraten (Abb. 15).



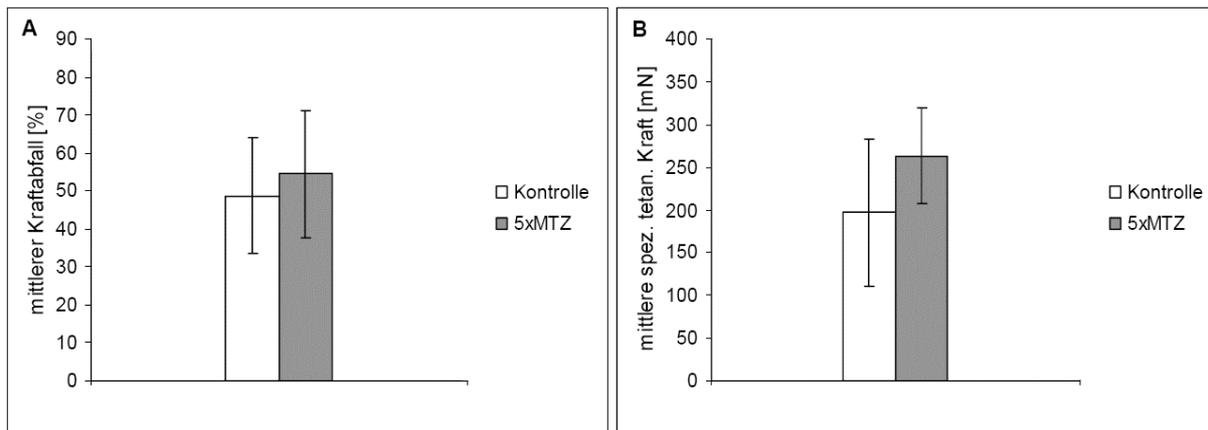
**Abb. 15: Representative NCAM-Immunfluoreszenzfärbung der regenerierenden Fasern.** NCAM Färbung der Kontroll-Gruppe (A) und der 5x MTZ behandelten Gruppe (B).

#### 4.1.2 Isometrische Muskelkraftmessung

Das Vermögen therapeutischer Substanzen, die Kraftentwicklung zu verbessern, wurde mittels der isometrischen Muskelkraftmessung am isolierten Skelettmuskel und verschiedener Protokolle bestimmt, die es ermöglichen zwischen maximaler Kraftentwicklung (tetanische Kraft) und der Resistenz gegenüber exzentrischer Kontraktionen zu unterscheiden. Die Behandlung der Mäuse mit DCPM (20x Dosierung) erhöhte die spezifische tetanische Kraft im rechten *M. extensor digitorum longus* (EDL) signifikant um 40% (DCPM:  $282 \pm 64$  mN; Kontrolle:  $198 \pm 53$  mN;  $p = 0,034$ ) (Abb. 16 B). Vergleicht man die spezifische tetanische Kraft der behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe, wobei man linken und den rechten EDL zusammen nimmt, dann ergibt sich keine signifikante Verbesserung der Muskelkraftentwicklung (DCPM:  $245 \pm 73$  mN; Kontrolle:  $208 \pm 62$  mN) (Abb. 16 D). Eine Verbesserung der Muskelkraftentwicklung konnte in der zweiten Behandlungsgruppe mit niedrigerer Dosierung nicht beobachtet werden. So zeigten sich in den mit 5x DCPM behandelten Mäusen keine signifikanten Unterschiede der spezifischen tetanischen Kraft (DCPM:  $91 \pm 22$  mN; Kontrolle:  $97 \pm 26$  mN), gegenüber den unbehandelten Tieren. Des Weiteren wurde im EDL Muskel die maximale Kraftentwicklung mittels eines exzentrischen Kontraktionsprotokolls ermittelt, wobei eine Verlängerung des Muskels um 10% der Ruhelänge stattfand. Dieses Protokoll sollte über das Ermüdungsverhalten des Muskels Aufschluss geben, welches ein indirektes Maß für die Membranstabilität bei dystrophen Muskeln darstellt. Die Behandlung mit DCPM beider Dosierungen konnte diesen Parameter jedoch nicht verbessern. Der mittlere Kraftabfall nach exzentrischer Kontraktion ergab für die 5x Dosierung von DCPM keine signifikanten Unterschiede (DCPM:  $56 \pm 7\%$ ; Kontrolle:  $59 \pm 8\%$ ). Jedoch zeigen die Ergebnisse aus Abb. 16 A einen signifikant höheren mittleren Kraftabfall ( $p = 0,034$ ) in den mit 20x DCPM behandelten *mdx*-Mäusen ( $67 \pm 14\%$ ) im Vergleich zu *mdx*-Kontrollmäusen ( $46 \pm 15\%$ ). Diese Ergebnisse belegen, dass die Behandlung mit DCPM die effektive Muskelkraft zwar erhöhen, aber nicht das Ermüdungsverhalten der Muskelfasern bei Belastung verbessern konnte. Die 5x MTZ Behandlungsgruppe wies einen nicht-signifikant höheren mittleren Kraftabfall auf ( $55 \pm 17\%$  versus  $49 \pm 15\%$  in der Kontrollgruppe) (Abb. 17 A), während die spezifische tetanische Kraft in den 5x MTZ behandelten *mdx*-Mäusen, wie in Abb. 17 B gezeigt, um 35% zunahm (MTZ:  $264 \pm 57$  mN; Kontrolle:  $197 \pm 86$  mN;  $p = 0,05$ ).



**Abb. 16: Muskelkraftmessung des EDL mit CA-Inhibitor-behandelter und mit Kontrollfutter behandelter *mdx*-Mäuse.** (A und B) Muskelkraftmessung des rechten EDL-Muskels 6 Monate alter männlicher *mdx*-Mäuse im Anschluss an die 120-tägige Behandlung mit 20x DCPM ( $n_{\text{Kontrolle}} = 14$ ,  $n_{\text{DCPM}} = 12$ ). (A) Mittlerer Kraftabfall nach exzentrischer Kontraktion und (B) mittlere spezifische tetanische Kraft nach der Normalisierung der tetanischen Maximalkraft über die CSA (cross sectional area). (C und D) Muskelkraftmessung beider EDL-Muskeln 6 Monate alter männlicher *mdx*-Mäuse im Anschluss an die 120-tägige Behandlung mit 20x DCPM ( $n_{\text{Kontrolle}} = 14$ ,  $n_{\text{DCPM}} = 12$ ). (C) Mittlerer Kraftabfall nach exzentrischer Kontraktion (D) mittlere spezifische tetanische Kraft nach der Normalisierung der tetanischen Maximalkraft über die CSA (cross sectional area). Die Messwerte sind wiedergegeben als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung; Abweichung von der Kontrolle mit \*  $p < 0,05$ .



**Abb. 17: Muskelkraftmessung des EDL CA-Inhibitor-behandelter und mit Kontrollfutter behandelter *mdx*-Mäuse.** (A und B) Muskelkraftmessung des EDL 6 Monate alter weiblicher *mdx*-Mäuse im Anschluss an die 120-tägige Behandlung mit 5x MTZ ( $n_{\text{Kontrolle}} = 12$ ,  $n_{\text{MTZ}} = 10$ ). (A) Mittlerer Kraftabfall nach exzentrischer Kontraktion von *mdx*-Kontrollmäusen und 5x MTZ-behandelten *mdx*-Mäusen (B) mittlere spezifische tetanische Kraft nach der Normalisierung der tetanischen Maximalkraft über die CSA. Messwerte sind wiedergegeben als mittlere  $\pm$  Standardabweichung.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass mit Ausnahme der Parameter aus dem exzentrischen Kontraktionstest, diese Substanzen dazu in der Lage waren den dystrophen Phänotyp der *mdx*-Maus zu verbessern.

## 4.2 Entwicklung eines neuen Mausmodells ( $dys^{-/-}/chip^{-/-}$ bzw. $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )

### 4.2.1 Charakterisierung der Aus- und Inzuchtlinie

#### 4.2.1.1 Zucht und Sterblichkeit der Mauslinie $dys^{-/-}/chip^{-/-}$ bzw. $dys^{-y}/chip^{-/-}$

Bei beiden Zuchtansätzen wurde die Kontrollgruppe jeweils aus Geschwister-Tieren rekrutiert. Durch den Geschwistervergleich wurde ein vergleichbarer genetischer Hintergrund in der Knockoutgruppe und den Kontrollen gewährleistet. Dadurch sollten die Ergebnisse valider und aussagekräftiger werden.

Nach Mendel wäre folgende Genotypenverteilung pro Wurf zu erwarten: 12,5%  $dys^{-/-}/chip^{+/+}$  bzw.  $dys^{-y}/chip^{+/+}$ , 12,5%  $dys^{-/-}/chip^{-/-}$  bzw.  $dys^{-y}/chip^{-/-}$  und 25%  $dys^{-/-}/chip^{+/-}$  bzw.  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ . Die durchschnittliche Wurfgröße in beiden Zuchtlinien betrug 5-10 Tiere. Somit sollten pro Wurf etwa 0,63-1,25 homozygote Knockoutmäuse beiderlei Geschlechts auftreten. Die Zucht einer  $dys^{-/-}/chip^{-/-}$ - bzw.  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ -Mauslinie war nur in der Inzuchtlinie erfolgreich, in der allerdings nur wenige  $dys^{-y}/chip^{-/-}$  Tiere (n = 4) das Alter von 3 Monaten erreichten. Die Auszuchtlinie lieferte keine für den *chip*-Knockout homozygoten Tiere. Auch die Aufzucht mit Ammen der Linie Hsd:ICR (CD-1<sup>®</sup>) (Harlan Laboratories Inc.) konnte die Überlebensrate nicht verbessern.

#### 4.2.1.2 Gewichtsentwicklung und Lebensalter in der Auszuchtlinie

Für die Auszuchtlinie wurde die Gewichtsentwicklung von  $dys^{-y}/chip^{+/+}$ - und  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ -Mäusen über einen Zeitraum von 12 Monaten dokumentiert. Als Kontrollen wurden auch C57BL/10-Mäuse und *mdx*-Mäuse über die gleiche Zeitspanne hinweg gewogen. Dabei wurde beobachtet, dass die Tiere der Auszuchtlinie bereits im Alter von einem Monat ein höheres Anfangsgewicht besitzen als die C57BL/10- oder *mdx*-Mäuse ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $22,3 \pm 4,0$ g;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $21,5 \pm 4,2$ g; C57BL/10:  $18,6 \pm 3,5$  g; *mdx*:  $18,2 \pm 2,7$ g). Die Gewichtszunahme innerhalb von 12 Monaten entwickelt sich jedoch bei allen Gruppen analog ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $36,0 \pm 9,1$ %;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $36,4 \pm 12,4$ %; C57BL/10:  $38,6 \pm 11,6$ %; *mdx*:  $39,7 \pm 9,0$ %). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 18 zusammengestellt.

Weiterhin zeigt sich, dass die Mäuse der Auszuchtlinie ein mit Wildtyp-Mäusen vergleichbares Lebensalter erreichen.

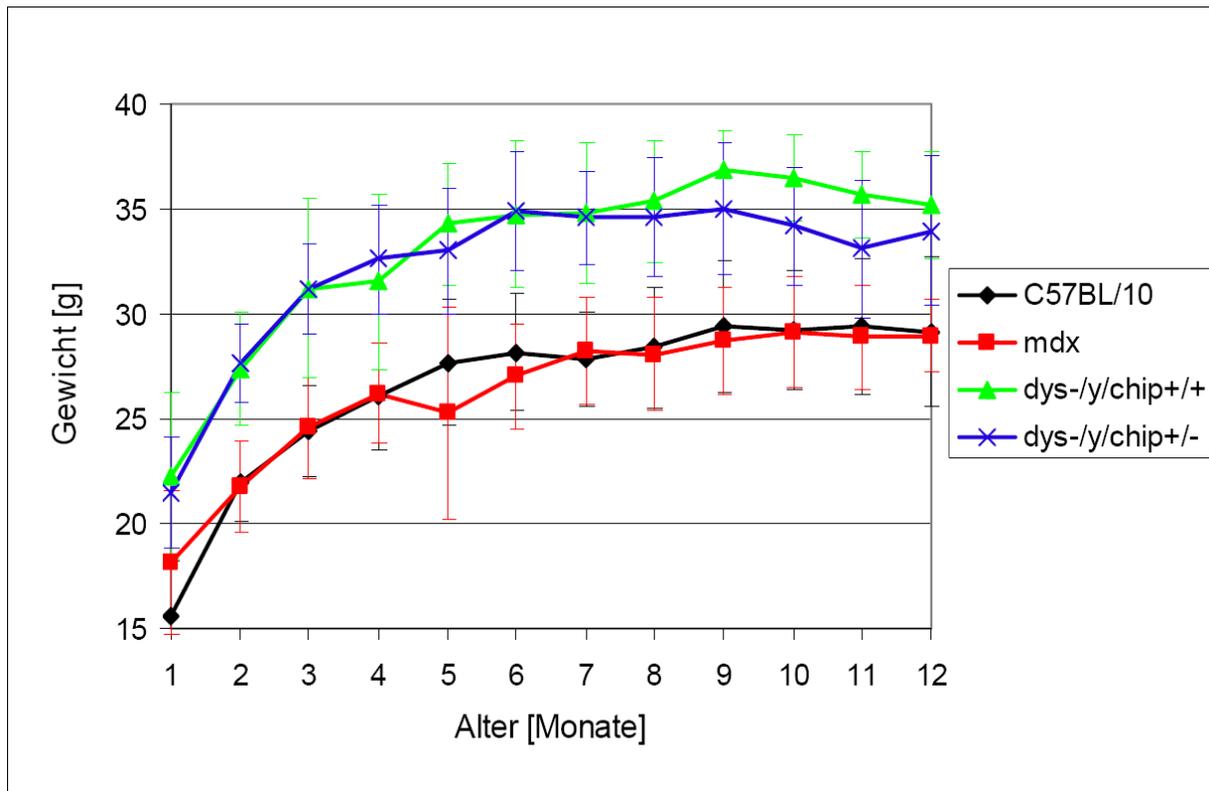
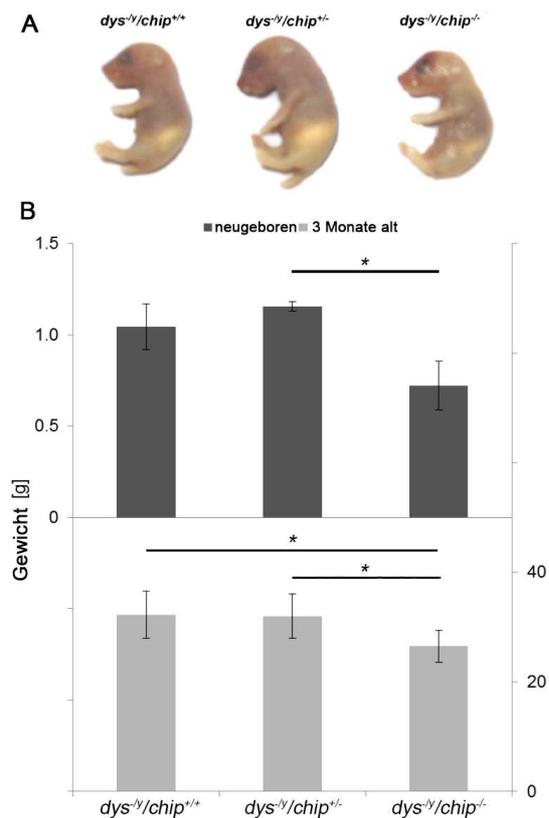


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Gewichtszunahme über 12 Monate in den C57BL/10- (schwarz), *mdx*- (rot), ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>Aus<sup>-</sup></sub> (grün) und ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>Aus<sup>-</sup></sub>-Mäusen (blau).

#### 4.2.1.3 Gewicht, Größe und Lebensalter in der Inzuchtlinie

In der Inzuchtlinie konnte aufgrund der hohen Sterblichkeit der homozygoten Knockout-Mäuse keine Gewichtsentwicklung über einen längeren Zeitraum dokumentiert werden. Daher wurden die Größe und das Gewicht neugeborener Mäuse der drei Genotypen  $dys^{-y}/chip^{+/+}$ ,  $dys^{-y}/chip^{+/-}$  und  $dys^{-y}/chip^{-/-}$  bestimmt. Bei den drei Monate alten Mäusen wurde lediglich das Gewicht ermittelt. Auffällig war, dass die heterozygoten Tiere schon bei der Geburt größer waren als die Kontrollmäuse. Die homozygoten Knockout-Mäuse waren jedoch noch kleiner als die Kontrollmäuse (Abb. 19).



**Abb. 19: Größenvergleich (A) neugeborener Wurfgeschwister und Gewichtsvergleich (B) neugeborener und 3 Monate alter Mäuse verschiedenen Genotyps der Inzuchtlinie.** Neugeborene Mäuse:  $n_{dys^{-/y}/chip^{+/+}} = 3$ ;  $n_{dys^{-/y}/chip^{+/-}} = 4$ ,  $n_{dys^{-/y}/chip^{-/-}} = 3$ ; 3 Monate alte Mäuse:  $n_{dys^{-/y}/chip^{+/+}} = 9$ ;  $n_{dys^{-/y}/chip^{+/-}} = 10$ ,  $n_{dys^{-/y}/chip^{-/-}} = 4$ . Die Messwerte sind wiedergegeben als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung; Abweichung von der Kontrolle mit \*  $p < 0,05$ .

Das Lebensalter von Kontrollmäusen und heterozygoten Knockoutmäusen erreicht das Lebensalter von Wildtyp-Mäusen, während die homozygoten Knockoutmäuse oftmals wenige Tage nach oder während der Geburt starben. Nur sehr wenige dieser Tiere ( $n = 4$ ) erreichten ein Alter von 3 Monaten.

#### 4.2.2 Funktionelle und biochemische Charakterisierung der Inzucht-Mauslinie

##### 4.2.2.1 Isometrische Muskelkraftmessung

Die isometrische Muskelkraftmessung stellt eine geeignete Methode dar, um im physiologischen Kontext funktionelle Unterschiede im Muskel aufzuzeigen. Um abschätzen zu können, welchen Einfluss der genetische Hintergrund in den verschiedenen Zuchtansätzen besaß, wurden auch Messungen in C57BL/10 Wildtyp-Mäusen und *mdx*-Mäusen für alle Zeitpunkte (3, 6 und 12 Monate) durchgeführt.

*Die mittlere spezifische tetanische Kraft und der mittlere Kraftabfall sind signifikant unterschiedlich zwischen Wildtyp-Mäusen und mdx-Mäusen*

Betrachtet man Wildtyp-Mäuse C57BL/10 und *mdx*-Mäuse, so liefert der Vergleich des mittleren Kraftabfalls und der mittleren spezifischen tetanischen Kraft für alle Alterstufen (3, 6 und 12 Monate) signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) (Abb. 20 C bzw. 20 F). Dabei erhöhte sich der mittlere Kraftabfall in den *mdx*-Mäusen auf  $45 \pm 11\%$  gegenüber der Wildtyp-Gruppe mit einem mittleren Kraftabfall von  $21 \pm 8\%$  (Abb. 20 C). Der Parameter des mittleren Kraftabfalls spiegelt das Ausmaß der Ermüdung des Muskels wieder. Bezüglich dieses Parameters unterschieden sich Wildtyp-Mäuse und *mdx*-Mäuse beträchtlich. Ausgewachsene (45 Wochen alt) *mdx*-Mäuse weisen einen Verlust an Muskelkraft von bis zu 65% auf, während Wildtyp-Mäuse einen geringeren Verlust von etwa 2% zeigen (Head *et al.*, 1992).

Dagegen ist die mittlere spezifische tetanische Kraft in den Wildtyp-Tieren etwa 23% höher als in den *mdx* Mäusen (Abb. 20 F, C57BL/10:  $284 \pm 59\text{mN}$ ; *mdx*:  $231 \pm 36\text{mN}$ ).

*Die isometrische Muskelkraftmessung zeigt generelle Unterschiede zwischen Auszucht- und Inzuchtlinie*

Da für die Inzuchtlinie nur drei Monate alte Tiere gemessen wurden, soll auch nur dieser Zeitpunkt im Folgenden verglichen werden. Die Inzuchtlinie wies in allen Gruppen einen höheren mittleren Kraftabfall in Folge einer exzentrischen Stimulation in den  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{\text{In}}$ - ( $55 \pm 18\%$ ) und in den  $(dys^{-y}/chip^{+/-})_{\text{In}}$ -Mäusen ( $41 \pm 10\%$ ) auf als die entsprechenden Mäuse der Auszuchtlinie [ $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{\text{Aus}}$ :  $30 \pm 12\%$ ;  $(dys^{-y}/chip^{+/-})_{\text{Aus}}$ :  $25 \pm 11\%$ ]. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 20 A und 21 A dargestellt.

Die spezifische tetanische Kraftentwicklung war in allen Gruppen der Inzuchtlinie höher als in den drei Monate alten Auszuchtieren (vgl. Tabelle 1: Inzuchtlinie und Tabelle 2: Auszuchtlinie). Siehe dazu die Abbildungen 20 D und 21 D.

*In der isometrischen Muskelkraftmessung wurde ein größerer Unterschied zwischen  $dys^{-y}/chip^{+/+}$ -Mäusen der Auszuchtlinie und *mdx*-Mäusen als zwischen  $dys^{-y}/chip^{+/+}$ -Mäusen der Inzuchtlinie und *mdx*-Mäusen festgestellt*

Interessant ist auch der Vergleich der Tiere der Inzucht- und Auszuchtlinie, die den Genotyp  $dys^{-y}/chip^{+/+}$  besitzen, mit *mdx*-Mäusen, die denselben Genotyp bezüglich dieser beiden Loci aufweisen. Der Vergleich des mittleren Kraftabfalls und der mittleren spezifischen tetanischen Kraftentwicklung, lässt für die Inzuchtlinie für beide Parameter eine stärkere

Annäherung an die Werte in den *mdx*-Tieren erkennen [siehe Tabelle: Inzuchtlinie; *mdx*:  $45 \pm 11\%$ ,  $231 \pm 36\text{mN}$ ]. In den Abbildungen 20 B bzw. E und 21 B bzw. E sind der mittlere Kraftabfall bzw. die mittlere spezifische tetanische Kraftentwicklung der ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>-Tiere bzw. ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>Aus</sub>-Tiere jeweils gegen die entsprechenden *mdx*-Mäuse aufgetragen.

*Trends und Relationen verhalten sich innerhalb der verschiedenen Gruppen für die einzelnen Zuchtlinien gleich*

Generell zeigt sich, dass die Mäuse der Auszucht- und Inzuchtlinie im Alter von drei Monaten dieselben Trends und Relationen in der isometrischen Muskelkraftmessung innerhalb der verschiedenen Gruppen der einzelnen Zuchtlinien aufweisen. So wurde für beide Zuchtlinien eine Abnahme des Muskelkraftabfalls hin zum *chip*-Knockout beobachtet (Abb. 20 A und 21 A), während die mittlere spezifische tetanische Kraft in den verglichenen Gruppen konstant blieb (Abb. 20 D und Abb. 21 D).

*Der mittlere Kraftabfall zeigte keine signifikante Veränderung in den Mäusen der Auszuchtlinie*

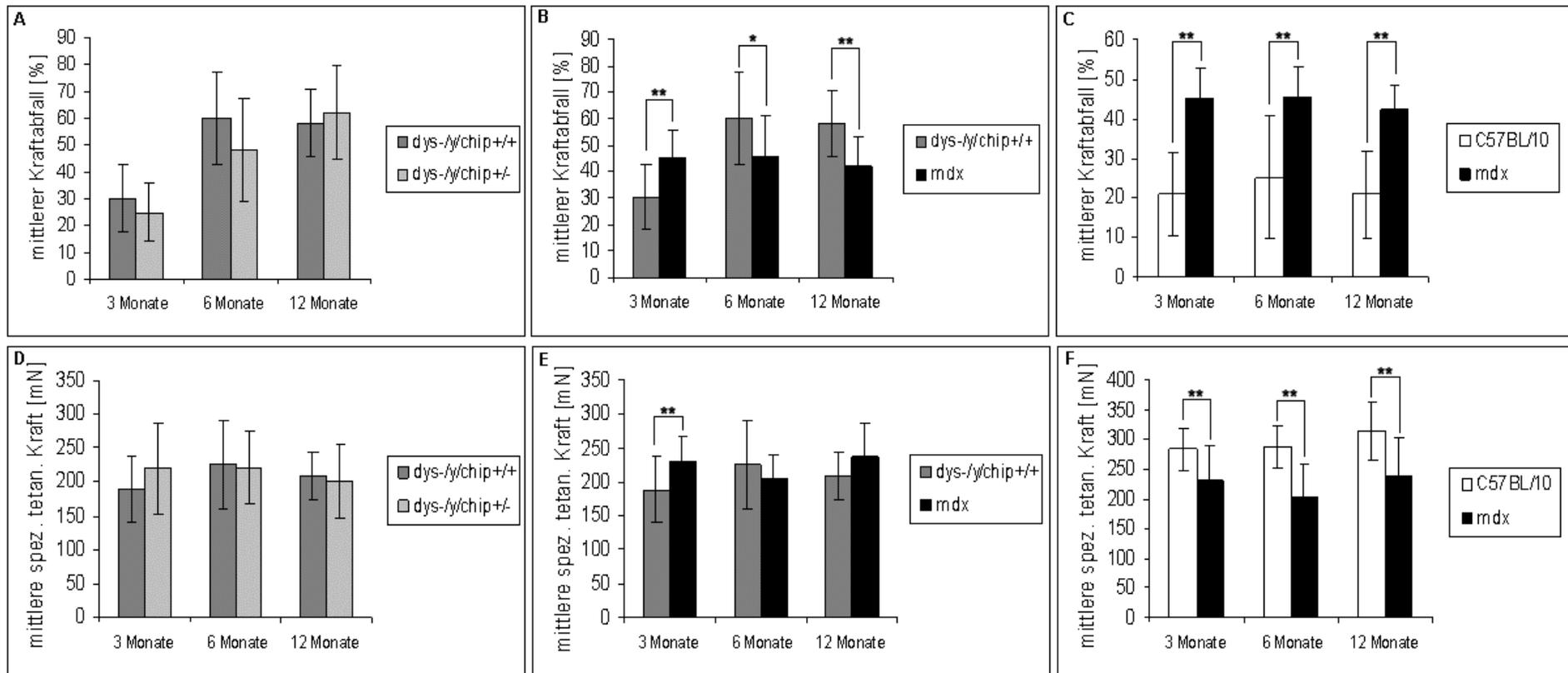
Durch die exzentrische Stimulation ließ sich der Einfluss des *chip*-Knockouts auf die Muskelermüdung beurteilen. In der Auszuchtlinie zeigt sich keine signifikante Veränderung des mittleren Kraftabfalls für die Zeitpunkte drei, sechs und zwölf Monate zwischen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>Aus</sub>- und ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>Aus</sub>-Mäusen. Dabei verdoppelte sich der Kraftverlust von drei über sechs nach zwölf Monaten in beiden Gruppen (Abb. 20 A). Während der mittlere Kraftabfall zu den beiden Zeitpunkten bei drei und sechs Monaten in den ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>Aus</sub>-Mäusen geringer war als in den ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>Aus</sub>-Tieren (siehe Tabelle 1: Auszuchtlinie), zeigte sich dieser Parameter in zwölf Monate alten Tieren in beiden Gruppen etwa gleich (( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>Aus</sub>:  $62 \pm 17\%$  und ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>Aus</sub>:  $58 \pm 13\%$ ).

*Der heterozygote und der homozygote Knockout von chip verbesserte signifikant die Resistenz gegenüber Ermüdung des Muskels der Inzuchttiere*

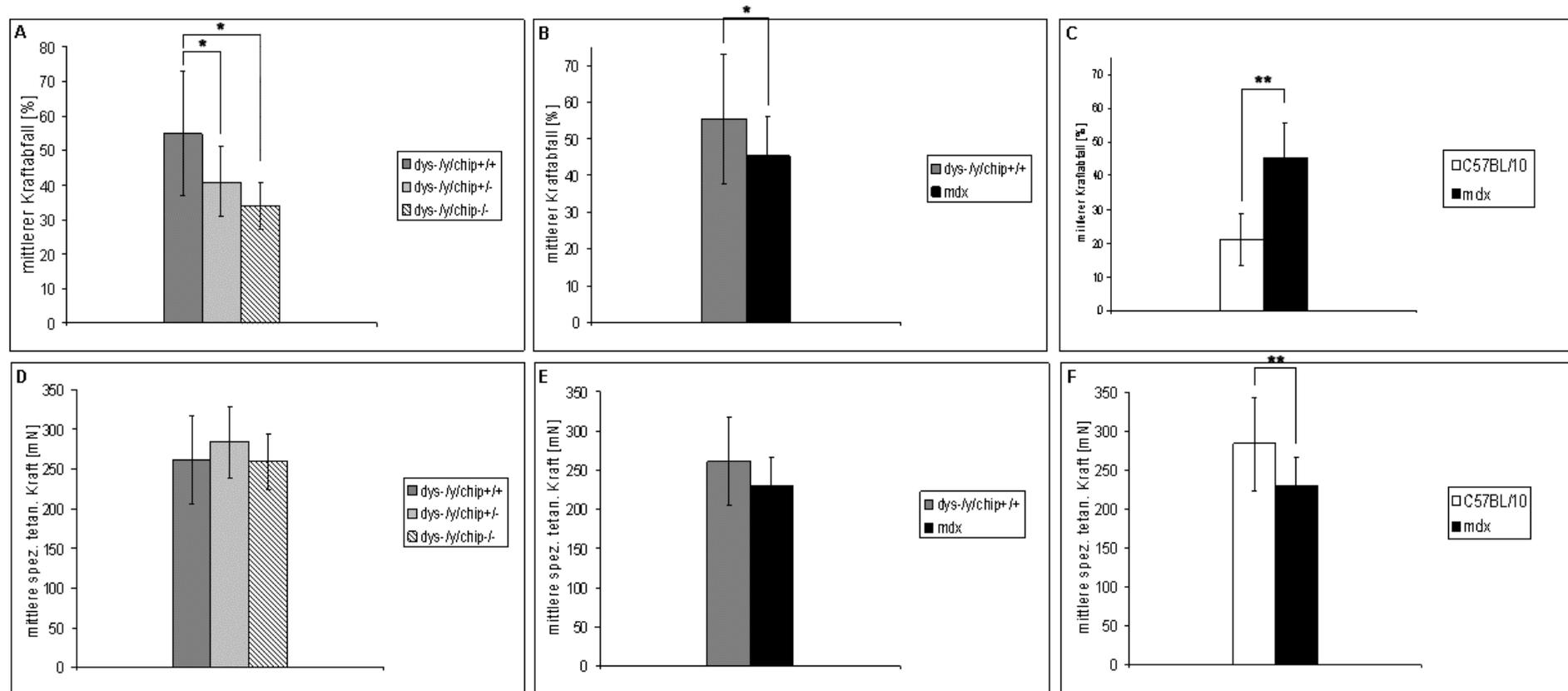
In der Inzuchtlinie wurde nach einer exzentrischen Stimulation eine signifikante Verbesserung der Muskelermüdung ( $p < 0,01$ ) in den ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>-Tieren ( $55 \pm 18\%$ ), verglichen sowohl mit den ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>In</sub>-Mäusen ( $41 \pm 10\%$ ) als auch mit den ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Mäusen ( $34 \pm 7\%$ ), festgestellt (Abb. 21 A; siehe auch Tabelle 2: Inzuchtlinie).

*Die spezifische tetanische Kraftentwicklung des EDL blieb in allen Gruppen der Inzucht- und Auszuchtlinie konstant*

Vergleicht man die mittlere spezifische tetanische Kraftentwicklung innerhalb beider Gruppen der Auszuchtlinie, ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>Aus</sub> und ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>Aus</sub>, so zeigen sich für alle Zeitpunkte sehr geringe Abweichungen (Abb. 20 D; siehe auch Tabelle 1: Auszuchtlinie). Sehr ähnlich verhielt es sich in der Inzuchtlinie in allen drei Gruppen, ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub> ( $262 \pm 56\text{mN}$ ), ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>In</sub> ( $284 \pm 45\text{mN}$ ) und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub> ( $260 \pm 35\text{mN}$ ) (Abb. 21 D; siehe Tabelle 2: Inzuchtlinie).



**Abb. 20: Isometrische Muskelkraftmessung der EDL von drei, sechs und zwölf Monate alten männlichen ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ ,  $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>Aus</sub>- Mäusen, sowie von  $mdx$ - und C57BL/10-Mäusen.** (A-C) Mittlerer Kraftabfall nach exzentrischer Kontraktion (A) der ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>Aus</sub>-Mäuse aufgetragen gegen Messwerte der ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>Aus</sub>-Mäuse, (B) der ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>Aus</sub>-Mäuse aufgetragen gegen Messwerte der  $mdx$ -Mäuse und (C) der C57BL/10-Mäuse aufgetragen gegen Messwerte der  $mdx$ -Mäuse. (D-F) Mittlere spezifische tetanische Kraft (D) der ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>Aus</sub>-Mäuse aufgetragen gegen Messwerte der ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>Aus</sub>-Mäuse, (E) der ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>Aus</sub>-Mäuse aufgetragen gegen Messwerte der  $mdx$ -Mäuse und (F) der C57BL/10-Mäuse aufgetragen gegen Messwerte der  $mdx$ -Mäuse. ( $n_{dys^{-y}/chip^{+/+}} = 16$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{+/-}} = 16$ ,  $n_{mdx} = 16$ ,  $n_{C57BL/10} = 16$ ). Die Messwerte sind wiedergegeben als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung; Abweichung mit \* $p < 0,02$ ; \*\*  $p < 0,001$ .



**Abb. 21: Muskelkraftmessung der EDL von drei Monate alten männlichen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ ,  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ ,  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>ln</sub>- Mäusen, sowie von  $mdx$ - und C57BL/10-Mäusen. (A-C) Mittlerer Kraftabfall nach exzentrischer Kontraktion (A) der ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>ln</sub>-Mäuse, ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>ln</sub>- und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>ln</sub>-Mäuse, (B) der ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>ln</sub>-Mäuse aufgetragen gegen Messwerte der  $mdx$ -Mäuse und (C) der C57BL/10-Mäuse aufgetragen gegen Messwerte der  $mdx$ -Mäuse. (D-F) Mittlere spezifische tetanische Kraft (D) der ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>ln</sub>-Mäuse, ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>ln</sub>- und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>ln</sub>-Mäuse, (E) der ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>ln</sub>-Mäuse aufgetragen gegen Messwerte der  $mdx$ -Mäuse und (F) der C57BL/10-Mäuse aufgetragen gegen Messwerte der  $mdx$ -Mäuse. ( $n_{dys^{-y}/chip^{+/+}} = 16$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{+/-}} = 16$ ,  $n_{mdx} = 16$ ,  $n_{C57BL/10} = 16$ ). Messwerte sind wiedergegeben als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung; Abweichung mit \*  $p < 0,02$ ; \*\*  $p < 0,001$ .**

<b>Auszuchtlinie</b>					
mittlerer Kraftabfall [%]					
3 Monate		6 Monate		12 Monate	
$dys^{-y}/chip^{+/+}$	$dys^{-y}/chip^{+/-}$	$dys^{-y}/chip^{+/+}$	$dys^{-y}/chip^{+/-}$	$dys^{-y}/chip^{+/+}$	$dys^{-y}/chip^{+/-}$
30 ± 12	25 ± 11	60 ± 17	48 ± 19	62 ± 17	58 ± 13
mittlere spezifische tetanische Kraft [mN]					
3 Monate		6 Monate		12 Monate	
$dys^{-y}/chip^{+/+}$	$dys^{-y}/chip^{+/-}$	$dys^{-y}/chip^{+/+}$	$dys^{-y}/chip^{+/-}$	$dys^{-y}/chip^{+/+}$	$dys^{-y}/chip^{+/-}$
190 ± 49	218 ± 68	226 ± 67	221 ± 53	208 ± 37	201 ± 54

Tabelle 1: Ergebnisse der isometrischen Muskelkraftmessung der Auszuchtlinie.

<b>Inzuchtlinie</b>		
mittlerer Kraftabfall [%]		
$dys^{-y}/chip^{+/+}$	$dys^{-y}/chip^{+/-}$	$dys^{-y}/chip^{-/-}$
55 ± 18	41 ± 10	34 ± 7
mittlere spezifische tetanische Kraft [mN]		
$dys^{-y}/chip^{+/+}$	$dys^{-y}/chip^{+/-}$	$dys^{-y}/chip^{-/-}$
262 ± 56	284 ± 45	260 ± 35

Tabelle 2: Ergebnisse der isometrischen Muskelkraftmessung der Inzuchtlinie.

#### 4.2.2.2 Western Blot Analyse

Aufgrund der Beobachtung in der isometrischen Muskelkraftmessung bei der Inzuchtlinie, dass sich die Resistenz gegenüber Ermüdung über den partiellen bis zum vollständigen Knockout von *chip* verbessert (Abb. 21), sollten die Expressionsmuster verschiedener Proteine mittels Western Blot Analyse ermittelt werden. Dabei bezog sich die Auswahl der Proteine, deren Muster bestimmt werden sollten, zunächst auf Kandidaten, die einen Beitrag zur Sarkolemmstabilität leisten. Als indirekte Marker für den Sarkomergehalt bzw. für die Sarkolemmstabilität dienten die Proteine  $\alpha$ -Aktinin-2 und  $\alpha$ -Dystroglykan. Des Weiteren wurde überprüft, ob sich die Expression des Dystrophin-Paralogs Utrophin in Folge der CHIP-Reduktion ändert. Damit sollte untersucht werden, ob eine Verringerung des muskelspezifischen proteasomalen Abbaus zu einer Änderung der Expression kompensatorischer Proteine führen kann, welche die Membranstabilität wiederherstellen können. Die Expressionsmuster wurden in den vier verschiedenen Muskelgruppen Diaphragma, *M. tibialis anterior*, *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* untersucht.

Die Western Blot Analyse wurde im DIA und EDL noch auf weitere Proteine ausgeweitet, da für das  $\alpha$ -Aktinin-2 eine signifikant erhöhte Expression in DIA und EDL der Tiere mit partiellem und vollständigem *chip*-Knockout zu finden war (siehe Abb. 23). Folglich wurde die Expression weiterer Proteine untersucht, welche im Zusammenhang mit  $\alpha$ -Aktinin-2 und/oder einem

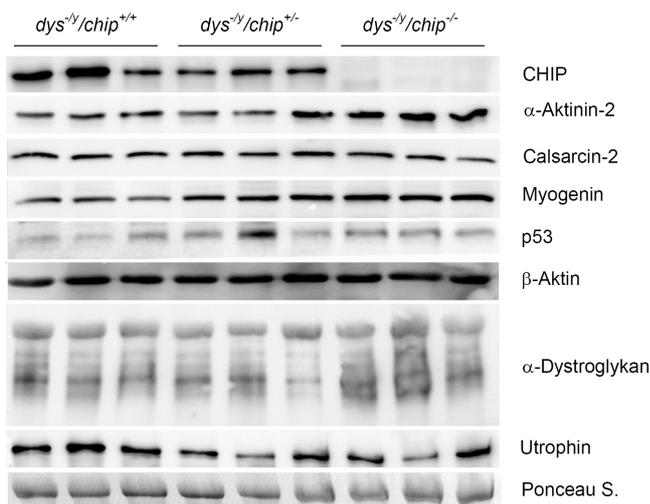
Ausdauerphänotyp stehen können. Dazu gehören Calsarcin-2 (Frey *et al.*,2000; Frey *et al.*,2004; Frey *et al.*,2008), Myogenin (Hughes *et al.*,1999; Li *et al.*,2004; Tintignac *et al.*,2005; Jogo *et al.*,2009) und p53 (Park *et al.*,2009). Bei p53 handelt es sich ebenfalls um ein Protein, welches direkt von CHIP abhängt (Esser *et al.*,2005).

Quantitativ wurde die relative Expression der Proteine  $\alpha$ -Dystroglykan, Utrophin,  $\alpha$ -Aktinin-2, Myogenin, Calsarcin-2 und p53 mit Hilfe der ImageJ Software ermittelt. Die Expression wurde auf die Expression der internen Kontrolle  $\beta$ -Aktin bzw. auf eine prominente Bande in der Ponceau S-Färbung normalisiert. Generell zeigte die Western Blot Analyse z. T. sehr hohe Standardabweichungen.

### a) Repräsentative Western Blot Analyse

Die Abbildung 22 zeigt einen repräsentativen Western Blot des Diaphragmas drei Monate alter Tiere der Inzuchtlinie. Die verschiedenen Expressionsmuster wurden immer relativ zur internen Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin bzw. der Ponceau S-Färbung betrachtet.

Die Western Blot Analyse bestätigte die Ergebnisse der Genotypisierung über PCR. Somit waren der partielle und der komplette Knockout von *chip* erfolgreich. Als Nachweis für den partiellen und vollständigen Knockout von *chip* nahm die CHIP-Expression in der Gruppe der ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>In</sub>-Tiere verglichen mit der Gruppe der ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>-Tiere ab und war in den ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Tieren nicht mehr detektierbar (Abb.22).



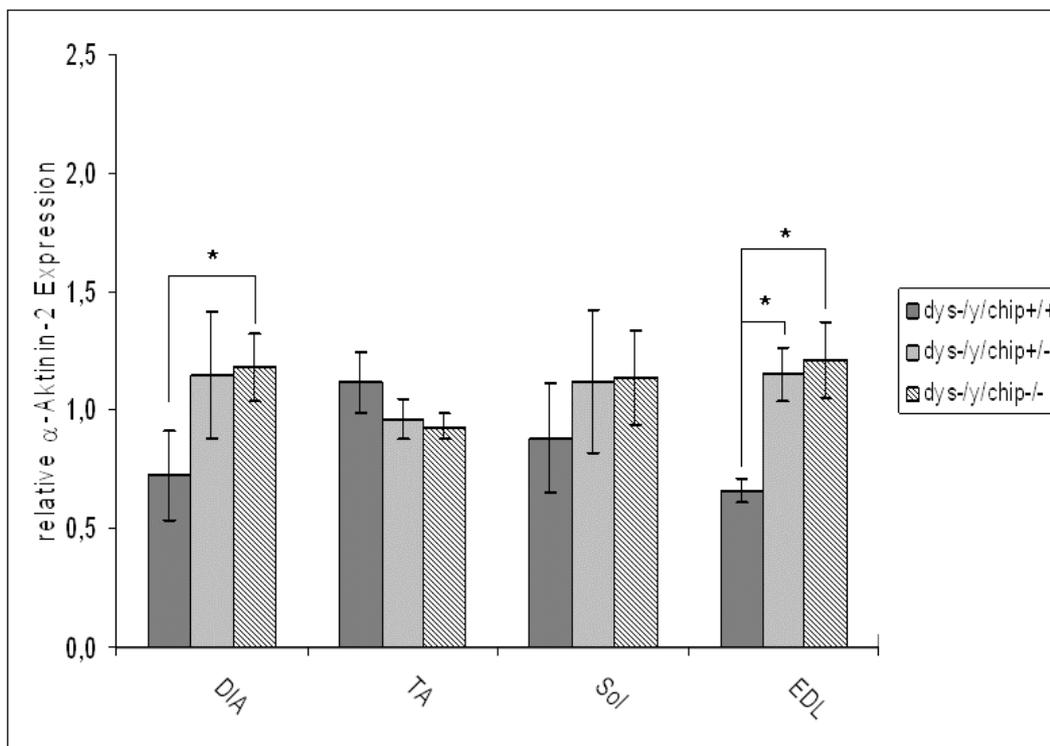
**Abb. 22: Western Blot Analyse der Inzuchtlinie. Repräsentativer Western Blot des Diaphragma von drei Monate alten männlichen  $dys^{-y}/chip^{+/+}$ -,  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ - und  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ - Mäusen der Inzuchtlinie.** Dargestellt ist die Proteinexpression von CHIP,  $\alpha$ -Aktinin-2, Calsarcin-2, Myogenin, p53,  $\beta$ -Aktin,  $\alpha$ -Dystroglykan und Utrophin. Die Expression von CHIP,  $\alpha$ -Aktinin-2, Calsarcin-2, Myogenin und p53 wurde auf die  $\beta$ -Aktin Expression normalisiert. Die Expression von  $\alpha$ -Dystroglykan und Utrophin wurde gegenüber einer Bande der Ponceau S-Färbung normalisiert. ( $n_{dys^{-y}/chip^{+/+}} = 3$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{+/-}} = 3$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{-/-}} = 3$ ).

Um eine präzisere Aussage über die Expression der einzelnen Proteine treffen zu können wurde eine Analyse mittels der ImageJ Software durchgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst.

### b) Expressionsmuster der Marker für einen Ausdauerphänotyp

Die Western Blot Analyse zeigt eine signifikante Zunahme von  $\alpha$ -Aktinin-2 in DIA und EDL in Inzuchtmäusen

Im *M. soleus* wurde eine nicht-signifikante Zunahme der Expression von  $\alpha$ -Aktinin-2 zwischen den Inzuchtmäusen verschiedenen Genotyps beobachten ( $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$ :  $0,88 \pm 0,23$ ;  $(dys^{-y}/chip^{+/-})_{In}$ :  $1,12 \pm 0,30$ ;  $(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}$ :  $1,14 \pm 0,20$ ). Dagegen wiesen Diaphragma ( $p=0,026$ ) und *M. extensor digitorum longus* ( $p = 0,005$ ) eine signifikante Zunahme der Expression von  $\alpha$ -Aktinin-2 zwischen  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$ -Tieren (DIA:  $0,72 \pm 0,18$ ; EDL:  $0,66 \pm 0,05$ ) und  $(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}$ -Tieren (DIA:  $1,18 \pm 0,14$ ; EDL:  $1,21 \pm 0,51$ ) auf (Abb. 23). Auch zwischen  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$ -Tieren ( $0,66 \pm 0,05$ ) und  $(dys^{-y}/chip^{+/-})_{In}$ -Tieren ( $1,15 \pm 0,11$ ) zeigte sich eine signifikante ( $p = 0,002$ ) Erhöhung der relativen  $\alpha$ -Aktinin-2 Expression im EDL (Abb. 23).



**Abb. 23: Relative Quantifizierung der  $\alpha$ -Aktinin-2 Expression in der Inzuchtlinie.**  $\alpha$ -Aktinin-2 Expression im Diaphragma (DIA), *M. tibialis anterior* (TA), *M. soleus* (Sol) und *M. extensor digitorum longus* (EDL) drei Monate alter männlicher  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$ ,  $(dys^{-y}/chip^{+/-})_{In}$  und  $(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}$  Mäuse der Inzuchtlinie. ( $n_{dys^{-y}/chip^{+/+}} = 3$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{+/-}} = 3$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{-/-}} = 3$ ). Die Messwerte sind wiedergegeben als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung; Abweichung mit \*  $p < 0,05$ .

*Calsarcin-2 ist im EDL homozygoter chip-Knockoutmäuse signifikant geringer exprimiert als in den heterozygoten Mäusen und in den Kontrollmäusen*

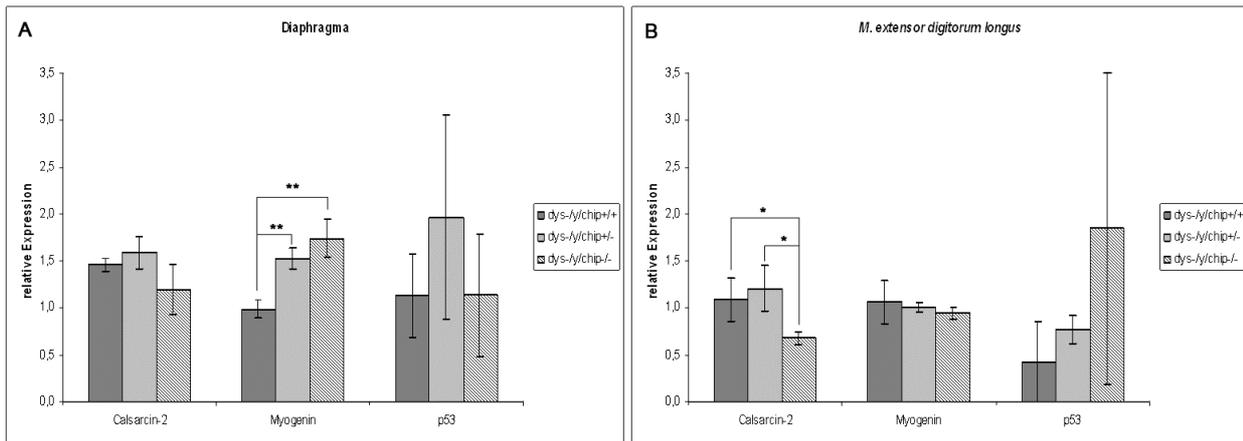
Im DIA und EDL wurde eine erniedrigte Expression von Calsarcin-2 in  $(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}$ -Mäusen (DIA:  $1,19 \pm 0,27$ ; EDL:  $0,68 \pm 0,07$ ) gegenüber jeweils den  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$ - oder  $(dys^{-y}/chip^{+/-})_{In}$ -Mäusen (DIA:  $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $1,46 \pm 0,07$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $1,59 \pm 0,18$ ; EDL:  $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $1,09 \pm 0,23$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $1,21 \pm 0,24$ ) nachgewiesen (Abb. 24). Zunächst nahm die Calsarcin-2 Expression in den  $(dys^{-y}/chip^{+/-})_{In}$ - Mäusen gegenüber den  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$ -Mäusen nicht-signifikant zu, fiel aber anschließend in den  $(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}$ -Mäusen unter den Wert der Kontrolle. Die Erniedrigung der Calsarcin-2-Expression war im EDL signifikant sowohl zwischen  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$ - und  $(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}$ -Mäusen ( $p = 0,04$ ), als auch zwischen  $(dys^{-y}/chip^{+/-})_{In}$ - und  $(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}$ -Mäusen ( $p = 0,02$ ) (Abb. 24 B).

*Die Proteinexpression von Myogenin nimmt im DIA signifikant zu*

Das Expressionsmuster von Myogenin zeigte eine unveränderte Expression im EDL in allen drei Genotypen der Inzuchtlinie ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $1,06 \pm 0,23$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $1,01 \pm 0,05$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $0,95 \pm 0,06$ ) (Abb. 24). Dagegen beobachtete man mit zunehmender CHIP-Reduktion eine signifikante Zunahme der Expression von Myogenin im DIA ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $0,99 \pm 0,10$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $1,53 \pm 0,11$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $1,74 \pm 0,22$ ) (Abb. 24 A). Für die Zunahme zwischen  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$ -Mäusen und  $(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}$ -Mäusen ergibt sich ein Signifikanzwert von  $p = 0,003$  und für die Zunahme zwischen  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$ -Mäusen und  $(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}$ -Mäusen ein Wert von  $p = 0,004$ .

*Das Expressionsmuster für p53 wies sehr große Standardabweichungen auf*

Die Expression von p53 zeigte sowohl im DIA als auch im EDL der Inzuchtlinie große Standardabweichungen, welche meist über 40% des eigentlichen Messwertes lagen oder z. T. diesen sogar übertrafen (Abb. 24). Dadurch konnten keine weiteren Aussagen zuverlässig getroffen werden (DIA:  $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $1,13 \pm 0,44$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $1,97 \pm 1,08$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $1,14 \pm 0,65$ ; EDL:  $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $0,42 \pm 0,44$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $0,77 \pm 0,15$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $1,84 \pm 1,66$ ).



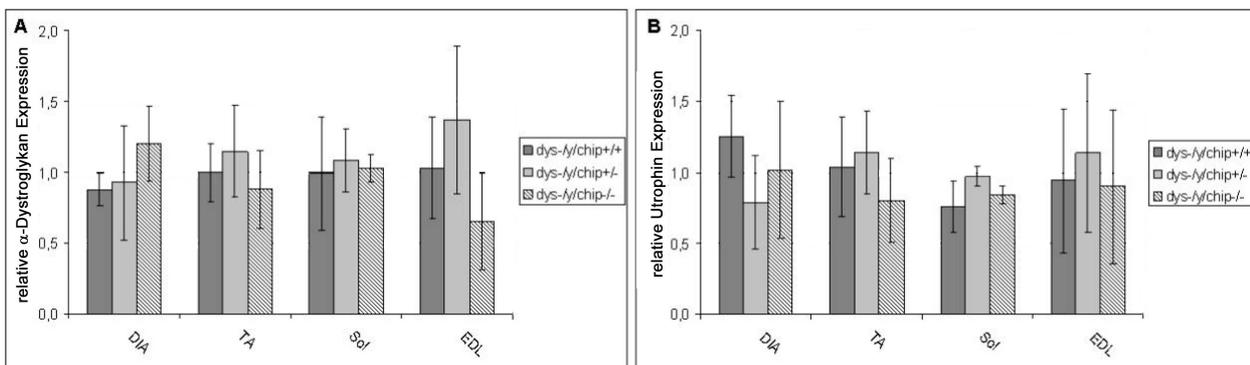
**Abb. 24: Relative Quantifizierung der Calsarcin-2, Myogenin und p53 Expression in der Inzuchtlinie.**

(A) Calsarcin-2, Myogenin und p53 Expression im Diaphragma (DIA) und (B) im *M. extensor digitorum longus* (EDL) drei Monate alter männlicher ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>-, ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>In</sub> und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Mäuse der Inzuchtlinie. ( $n_{dys^{-y}/chip^{+/+}} = 3$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{+/-}} = 3$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{-/-}} = 3$ ). Die Messwerte sind wiedergegeben als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung; Abweichungen mit \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

### c) Expressionsmuster der Marker für die Membranstabilität

Die Western Blot Analyse aller untersuchten Muskeln zeigte keine auffälligen oder signifikanten Veränderungen der Expression von  $\alpha$ -Dystroglykan und Utrophin

Die quantitative Analyse der Expression der Proteine  $\alpha$ -Dystroglykan und Utrophin in den Muskeln Diaphragma, *M. tibialis anterior* und *M. soleus* und *M. extensor digitorum longus* lieferte keine signifikanten Unterschiede zwischen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>-, ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>In</sub>- und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Tieren (Abb. 25).



**Abb. 25: Relative Quantifizierung der  $\alpha$ -Dystroglykan- und Utrophin-Expression in der Inzuchtlinie.**

(A)  $\alpha$ -Dystroglykan im Diaphragma (DIA), *M. tibialis anterior* (TA), *M. soleus* (Sol) und *M. extensor digitorum longus* (EDL) drei Monate alter männlicher ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>-, ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>In</sub>- und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Mäuse der Inzuchtlinie. (B) Utrophin im Diaphragma (DIA), *M. tibialis anterior* (TA), *M. soleus* (Sol) und *M. extensor digitorum longus* (EDL) drei Monate alter männlicher ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>-, ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>In</sub>- und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Mäuse der Inzuchtlinie. ( $n_{dys^{-y}/chip^{+/+}} = 3$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{+/-}} = 3$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{-/-}} = 3$ ). Die Messwerte sind wiedergegeben als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung.

Zusammenfassend lieferte die Western Blot Analyse folgende Ergebnisse: Während sich in der Inzuchtlinie die Marker für die Membranstabilität,  $\alpha$ -Dystroklykan und Utrophin, in den Kontrollmäusen und in den Tieren mit partiellem und vollständigem *chip*-KO kaum unterschieden (Abb. 25), zeigten die Marker für einen Ausdauerphänotyp,  $\alpha$ -Aktinin-2 (Abb. 23), Calsarcin-2 (Abb. 24) und Myogenin (Abb. 24) eindeutige Trends bezüglich der relativen Expression je nach Genotyp. So nahm  $\alpha$ -Aktinin-2 sowohl im DIA als auch im EDL signifikant mit zunehmendem *chip*-KO zu. Die relative Expression von Calsarcin-2 nahm dagegen im EDL signifikant und im DIA nicht-signifikant ab. Myogenin wies im DIA eine signifikante Zunahme der relativen Expression mit zunehmendem *chip*-KO auf, während die relative Expression im EDL etwa konsant blieb. p53, welches ebenfalls zu der Gruppe der Marker für einen Ausdauerphänotyp gezählt wurde, lieferte aufgrund hoher Standardabweichungen keine aussagekräftigen Daten (Abb. 24).

#### 4.2.2.3 Histochemie und Immunhistologie

Kennzeichen einer schwerwiegenden Muskeldystrophie sind das Vorhandensein eines hohen Anteils an Fasern mit zentral lokalisierten Zellkernen, ebenso vieler kleiner Fasern und ein hoher Grad an pathologischer Bindegewebsvermehrung (Fibrose). Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse aus der isometrischen Muskelkraftmessung und der Western Blot Analyse wurde hier noch eine histologische Untersuchung verschiedener histopathologisch relevanter Parameter durchgeführt und mittels des Moduls „MyoScan“ des Bildanalyseprogramms S.CORE und mit Hilfe des Analysetools der Firma Wimasis quantitativ ausgewertet. Der Einsatz des Analysetools „MyoScan“ lieferte die Parameter Anteil der Fasern mit zentral lokalisiertem Kern, die Fasergrößenverteilung und den Varianzkoeffizient (VC). Die Analyse des Anteils an fibrotischem Muskelgewebe wurde über das Analysetool der Firma Wimasis durchgeführt.

Um den in den heterozygoten und homozygoten Tieren gefundenen, stärker ausgeprägten Ausdauerphänotyp zu erklären, wurden zusätzlich die Fasertypenzusammensetzung und der oxidative Status der Fasern von Hand ausgezählt. Dazu wurden zum einen die MHC-Doppelfärbung und zum anderen eine SDH-Färbung der Inzuchttiere herangezogen. Betrachtet wurden diese Parameter im *M. tibialis anterior*, Diaphragma und im *M. soleus*, wobei die SDH-Färbung nur im DIA und TA analysiert wurde.

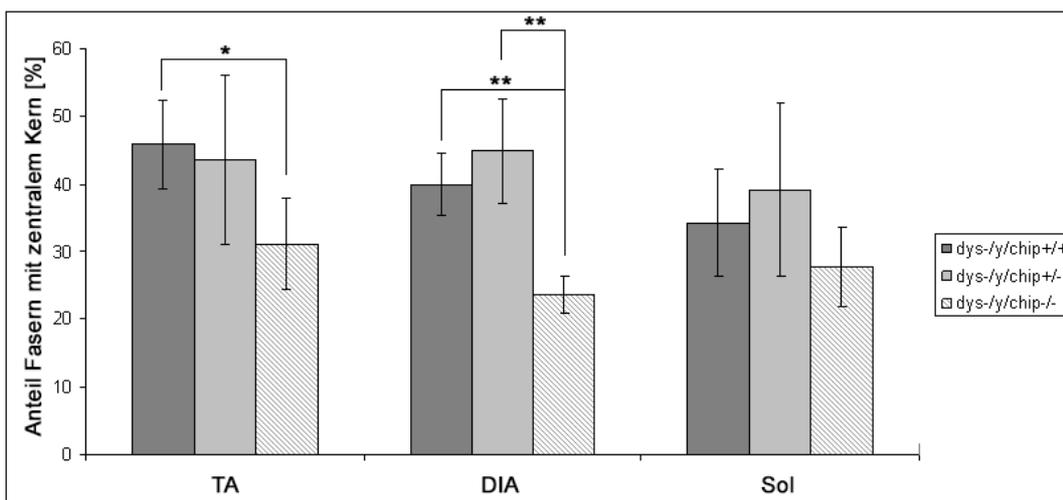
Die Analyse mittels „MyoScan“ und die Ermittlung des Fibrosegrades mittels des Analysetools der Firma Wimasis wurden nur in der Inzuchtlinie durchgeführt. Die Analyse der

Fasertypenzusammensetzung und des oxidativen Status der Fasern erfolgte wiederum nur an Tieren aus der Auszuchtlinie.

### a) Anteil an Fasern mit zentralem Zellkern

*Abnahme des Anteils an Fasern mit zentralem Kern in allen untersuchten Muskeln der Inzuchtlinie*

In allen drei Muskeln wurde eine Verringerung des Anteils an Fasern mit zentralen Kernen ermittelt. Im *M. tibialis anterior* lag die Verringerung bei einem Wert von 30%, im Diaphragma zwischen 40-50% und im *M. soleus* zwischen 20-30% (Abb. 26). Dabei ist der Anteil an Fasern mit zentralem Kern im *M. tibialis anterior* signifikant niedriger in den  $(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}$ -Tieren im Vergleich zu den  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$ -Tieren ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $45,88 \pm 6,45\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $31,11 \pm 6,84\%$ ;  $p = 0,013$ ). Das Diaphragma wies eine signifikante Erniedrigung des Anteils zentral lokalisierter Fasern zwischen sowohl  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$ -Tieren und  $(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}$ -Tieren ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $40,01 \pm 4,57\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $23,63 \pm 2,72\%$ ;  $p = 0,0004$ ) als auch zwischen  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$ -Tieren und  $(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}$ -Tieren ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $44,93\% \pm 7,75$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $23,63 \pm 2,72\%$ ;  $p = 0,001$ ) auf. Der *M. soleus* zeigte ebenfalls eine Verringerung des Anteils an Fasern mit zentralem Kern im Vergleich der Wildtyp-Tiere sowie der heterozygoten Gruppe jeweils mit den homozygoten Mäusen, jedoch war diese Verringerung nicht signifikant ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $34,25 \pm 7,99\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $39,14 \pm 12,93\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $27,71 \pm 5,97\%$ ;  $p > 0,05$ ).



**Abb. 26: Anteil an Fasern mit zentral lokalisierten Kernen in der Inzuchtlinie.** Untersucht wurden die Muskeln *M. tibialis anterior*, Diaphragma und *M. soleus* von drei Monate alten männlichen  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$ - (dunkelgrau),  $(dys^{-y}/chip^{+/-})_{In}$ - (hellgrau) und  $(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}$ -Mäusen (schraffiert) der Inzuchtlinie. Es wurden pro Muskel und Gruppe zwischen 700 und 5000 Fasern ausgewertet. ( $n_{(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}} = 5$ ,  $n_{(dys^{-y}/chip^{+/-})_{In}} = 5$ ,  $n_{(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}} = 4$ ). Die Daten sind wiedergegeben als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung; Abweichung mit \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,002$ .

### b) Fasergrößenverteilung und Varianzkoeffizient

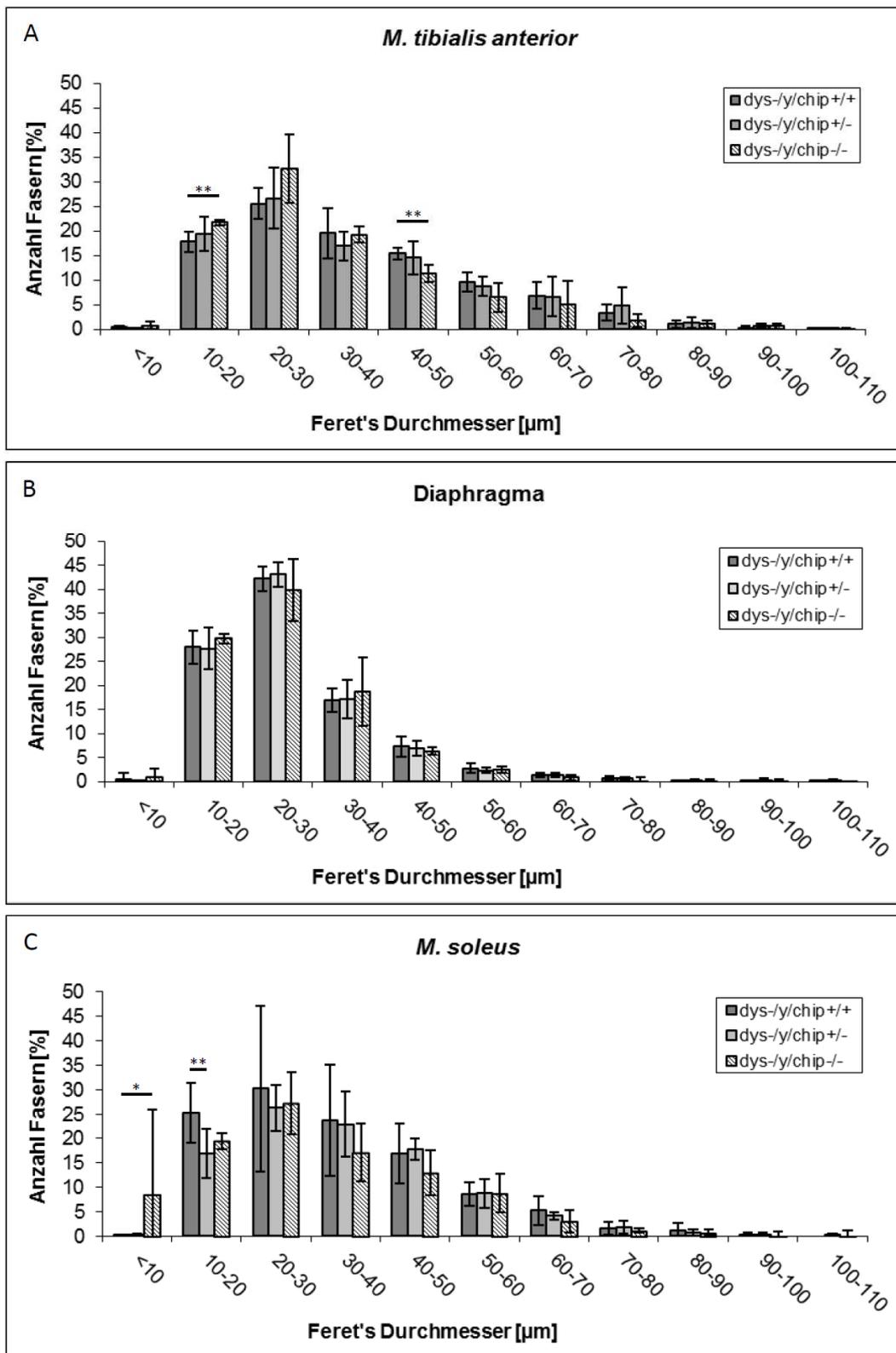
Über die Bestimmung des minimalen Feret's Durchmessers konnten die Fasergrößenverteilung und der Varianzkoeffizient (VC) ermittelt werden.

*Zunahme kleinerer Muskelfasern und gleichzeitige Abnahme mittelgroßer Fasern zwischen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>- und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Mäusen ohne Veränderung des Varianzkoeffizienten*

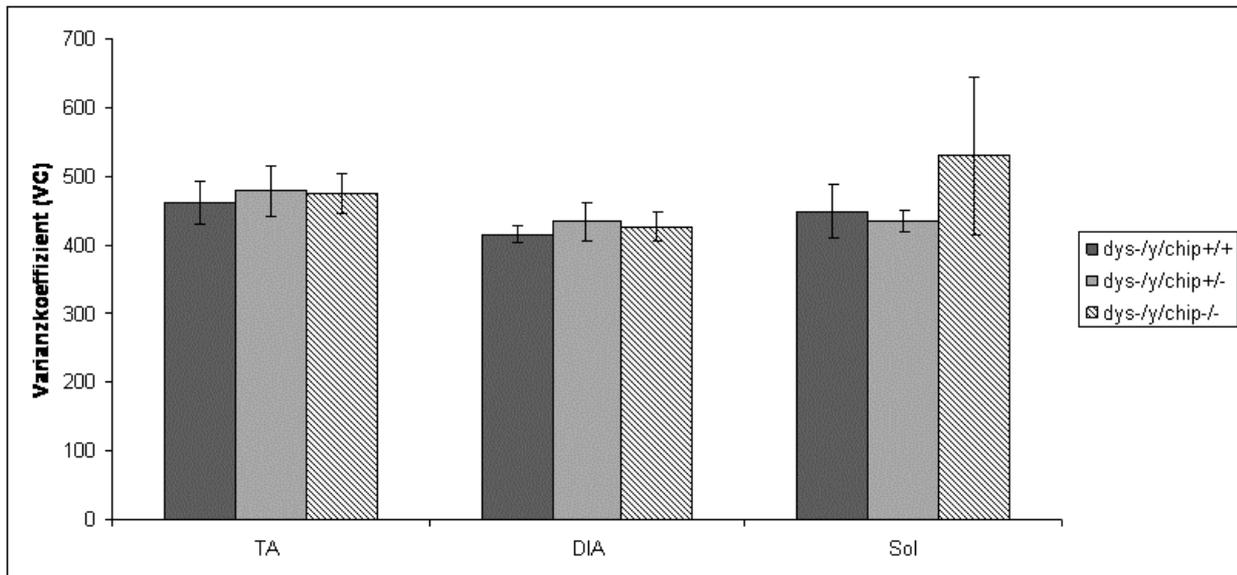
Abbildung 27 stellt die Fasergrößenverteilung in den drei untersuchten Muskeln der Inzuchtlinie dar. Im Diaphragma konnten keine Unterschiede in der Fasergrößenverteilung festgestellt werden. Dagegen zeigte der *M. tibialis anterior* eine Verschiebung hin zu kleineren Fasern und damit eine Zunahme von Fasern im Größenbereich von 10-30  $\mu\text{m}$  und eine Abnahme im Bereich von 40-70  $\mu\text{m}$  (Abb. 27 A). Die Zunahme kleiner Fasern im Bereich von 10-20  $\mu\text{m}$  war zwischen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>- und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Mäusen signifikant ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $17,81 \pm 2,07\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $21,63 \pm 0,53\%$ ;  $p = 0,009$ ). Im Bereich von 40-50  $\mu\text{m}$  verringerte sich die Fasergröße in den Muskeln der ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>- und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Mäuse ebenfalls signifikant ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $15,42 \pm 1,19\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $11,31 \pm 1,74\%$ ;  $p = 0,004$ ). Auch im *M. soleus* nahm die Anzahl kleinerer Fasern, hier im Bereich  $< 10 \mu\text{m}$ , in den ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren zu und im Bereich 10-20  $\mu\text{m}$  ab. Die Anzahl der Fasern mit dem minimalen Feret's Durchmesser von 10-20  $\mu\text{m}$  war zwischen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>- und ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>In</sub>-Mäusen signifikant erniedrigt ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $25,19 \pm 6,11\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $16,94 \pm 4,95\%$ ;  $p = 0,038$ ).

Wie in Abbildung 28 erkennbar ist, bestanden keine signifikanten Unterschiede bei den einzelnen Varianzkoeffizienten der verschiedenen Gruppen in den untersuchten Muskeln.

Im *M. tibialis anterior* wurde der Varianzkoeffizient in den ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>-Mäusen mit  $463 \pm 31$ , in den ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>In</sub>-Mäusen mit  $479 \pm 37$  und in den ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Mäusen mit  $476 \pm 29$  bestimmt. Die Varianzkoeffizienten des Diaphragma lagen in den ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>-Mäusen bei einem Wert von  $417 \pm 12$ , in den ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>In</sub>-Mäusen bei  $435 \pm 28$  und in den ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Mäusen bei  $427 \pm 21$ . *M. soleus* zeigte die größten Unterschiede bezüglich des Varianzkoeffizienten, wobei auch hier keine signifikante Veränderung aufgrund einer z. T. sehr großen Standardabweichung vorlag ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $450 \pm 39$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $435 \pm 15$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $531 \pm 114$ ;  $p > 0,05$ ).



**Abb. 27: Fasergrößenverteilung in der Inzuchtlinie.** Untersucht wurden die Muskeln *M. tibialis anterior* (A), Diaphragma (B) und *M. soleus* (C) von drei Monate alten männlichen ( $dys^{-/y}/chip^{+/+}$ )<sub>ln</sub>- (dunkelgrau), ( $dys^{-/y}/chip^{+/-}$ )<sub>ln</sub>- (hellgrau) und ( $dys^{-/y}/chip^{-/-}$ )<sub>ln</sub>-Mäusen (schraffiert) der Inzuchtlinie. Es wurden pro Muskel und Gruppe zwischen 700 und 5000 Fasern ausgewertet. ( $n_{(dys^{-/y}/chip^{+/+})ln} = 5$ ,  $n_{(dys^{-/y}/chip^{+/-})ln} = 5$ ,  $n_{(dys^{-/y}/chip^{-/-})ln} = 4$ ). Die Messwerte sind wiedergegeben als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung; Abweichung mit \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$ .



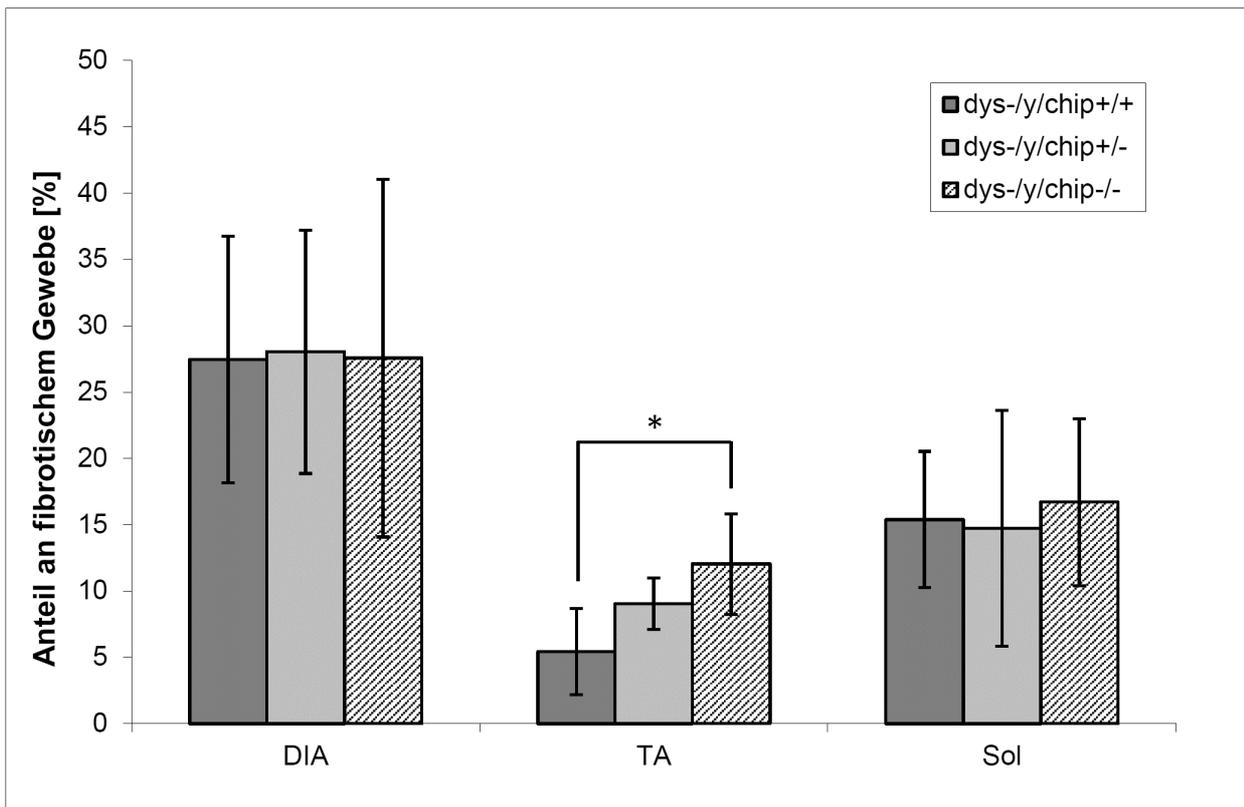
**Abb. 28: Varianzkoeffizienten in der Inzuchtlinie.** Untersucht wurden die Muskeln *M. tibialis anterior*, Diaphragma und *M. soleus* von drei Monate alten männlichen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>- (dunkelgrau), ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>In</sub>- (hellgrau) und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Mäusen (schraffiert) der Inzuchtlinie. Es wurden pro Muskel und Gruppe zwischen 700 und 5000 Fasern ausgewertet. ( $n_{(dys^{-y}/chip^{+/+})In} = 5$ ,  $n_{(dys^{-y}/chip^{+/-})In} = 5$ ,  $n_{(dys^{-y}/chip^{-/-})In} = 4$ ). Die Messwerte sind wiedergegeben als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung.

### c) Anteil an fibrotischem Gewebe

Muskeln von *mdx*-Mäusen zeigen starke Anzeichen von Degeneration und weisen einen Umbau von Muskelgewebe zu vorwiegend fibrotischen Gewebe auf (Torres *et al.*, 1987; Jejurikar *et al.*, 2003). Das fibrotische Gewebe wird in der Van Gieson-Färbung rosa angefärbt und ist somit vom eher bräunlich gefärbten intakten Muskelgewebe unterscheidbar.

*Die Van Gieson-Färbung zeigte nur im M. tibialis anterior der Inzuchtlinie einen erhöhten Anteil an fibrotischem Muskelgewebe in den Mäusen mit vollständigem chip-Knockout*

Generell beobachtete man bei der Auswertung des Anteils an fibrotischem Gewebe hohe Standardabweichungen von meist über 30% des Messwertes, wodurch die Ergebnisse keine zuverlässige Aussage zulassen (Abb. 29). Dennoch zeigte sich allein im TA der Inzuchtlinie eine signifikante Erhöhung des Anteils an fibrotischem Gewebe zwischen den ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>-Mäusen und den homozygoten Knockout Tieren ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $5,43 \pm 3,26\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $12,03 \pm 3,78\%$ ;  $p = 0,026$ ) (Abb. 29).



**Abb. 29: Anteil an fibrotischem Gewebe der Muskeln von Mäusen der Inzuchtlinie.** Untersucht wurden die Muskeln Diaphragma, *M. tibialis anterior* und *M. soleus* von 3 Monate alten männlichen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ ) (dunkelgrau), ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>ln</sub> (hellgrau) und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>ln</sub>-Mäusen (schraffiert) der Inzuchtlinie. Es wurden pro Gruppe die kompletten Muskelquerschnitte von  $n \geq 4$  Mäusen ausgewertet. ( $n_{dys^{-y}/chip^{+/+}} = 5$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{+/-}} = 5$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{-/-}} = 4$ ). Die Messwerte sind wiedergegeben als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung; Abweichung mit \*  $p < 0,05$ .

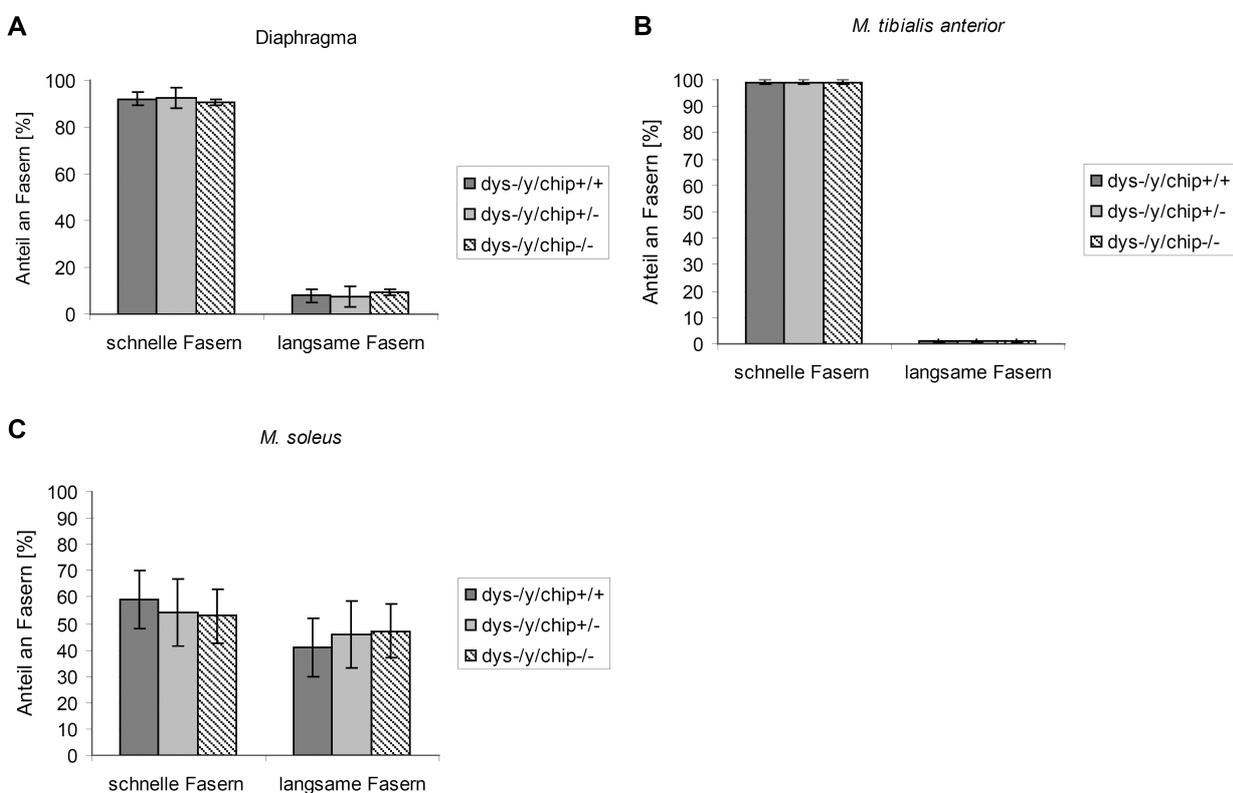
#### d) Fasertypenzusammensetzung und oxidativer Status der Fasern

Zusätzlich wurden die Fasertypenverteilung und der oxidative Status der Fasern von Hand ermittelt. Dazu wurden zum einen die MHC-Doppelfärbung und zum anderen eine SDH-Färbung der Muskeln der Inzuchttiere herangezogen.

*Die Fasertypenzusammensetzung zeigt einen leichten Trend hin zu einer Zunahme an langsamen Fasern mit partiellem und vollständigem chip-Knockout*

Bei der Auswertung der Fasertypenzusammensetzung der Muskeln Diaphragma, *M. tibialis anterior* und *M. soleus* wurden nur geringe Unterschiede zwischen den Gruppen verschiedenen Genotyps gefunden (Abb. 30). Im Diaphragma lag in den  $dys^{-y}/chip^{+/+}$ -Inzuchtmäusen ein Anteil von  $7,87 \pm 2,83\%$  an langsamen Fasern vor (Abb. 30 A). Dieser blieb in den Tieren mit partiellem *chip*-Knockout konstant, nahm aber in den Tieren mit vollständigem *chip*-Knockout geringfügig, aber nicht signifikant, zu ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $7,58 \pm 4,55\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $9,17 \pm 1,30\%$ ). Im *M. tibialis anterior* (Abb. 30 B) und *M. soleus* (Abb. 30 C) zeigte sich ein ähnliches Bild,

wobei im Sol eine deutlichere Zunahme an langsamen Fasern um etwa 7% im Vergleich der Kontrollmäuse mit den homozygoten Mäusen beobachtet wurde. Auch hier war die Zunahme jedoch statistisch nicht signifikant (TA:  $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $1,02 \pm 0,60\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $0,89 \pm 0,6\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $1,17 \pm 0,49\%$ ; Sol:  $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $40,72 \pm 11,05\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $45,91 \pm 12,85\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $47,14 \pm 10,31\%$ ). Dabei handelt es sich beim TA um einen schnell kontrahierenden Muskel, der hauptsächlich Fasern des schnellen Myosins (fMy) enthält. Der *M. soleus* dagegen ist ein langsam kontrahierender Muskel, der auch einen hohen Anteil an Fasern mit langsamem Myosin (sMy) besitzt.



**Abb. 30: Anteil an Fasern mit schnellem und langsamem Myosintyp pro Muskelquerschnitt von Mäusen der Inzuchtlinie.** Untersucht wurden die Muskeln Diaphragma, *M. tibialis anterior* und *M. soleus* von drei Monate alten männlichen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>ln</sub>- (dunkelgrau), ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>ln</sub>- (hellgrau) und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>ln</sub>-Mäusen (schraffiert) der Inzuchtlinie. Es wurden pro Gruppe die kompletten Muskelquerschnitte von  $n \geq 4$  Mäusen ausgewertet. ( $n_{dys^{-y}/chip^{+/+}} = 5$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{+/-}} = 5$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{-/-}} = 4$ ). Messwerte sind wiedergegeben als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung.

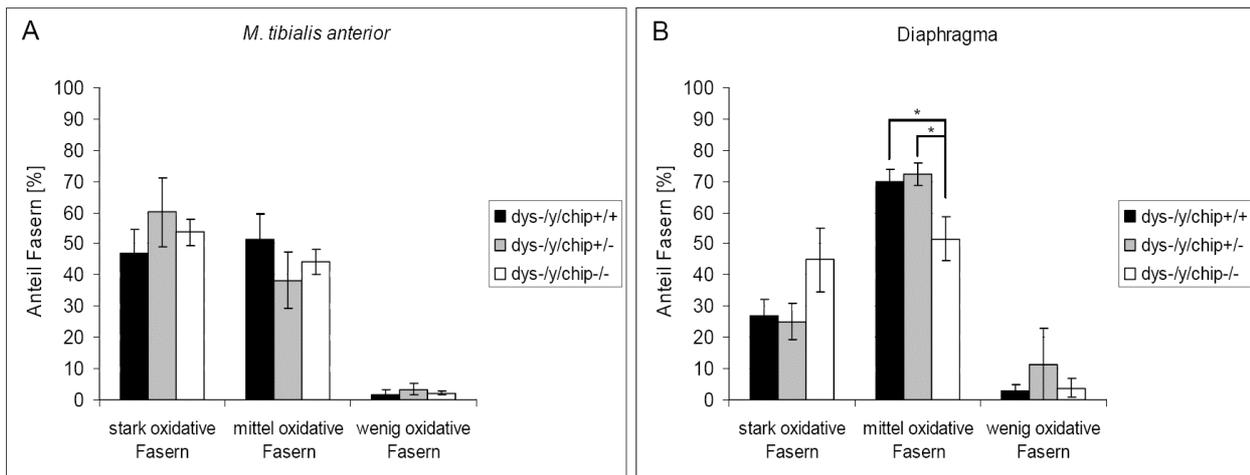
*Der oxidative Status der Fasern erfährt eine Verschiebung zu einem höheren Anteil an stärker oxidativen Fasern in den hetero- und homozygoten Knockoutmäusen*

Der Anteil an Fasern, welche einen stärker oxidativen Stoffwechsel betreiben, nimmt in den heterozygoten Inzuchtmäusen des *M. tibialis anterior* um ca. 13% gegenüber den Kontrollmäusen nicht-signifikant zu ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $47,15 \pm 7,58\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $60,10 \pm 11,07\%$ ). Dabei nahmen die Fasern mit mittelstarkem oxidativen Phänotyp zu etwa dem gleichen Anteil ab ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $51,26 \pm 8,65\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $38,33 \pm 9,21\%$ ) (Abb. 31).

In den homozygoten Knockoutmäusen war der Anteil an Fasern mit stärker oxidativem Stoffwechsel noch um etwa 6% gegenüber den Kontrollmäusen nicht-signifikant erhöht, aber etwa 7% geringer verglichen mit den heterozygoten Mäusen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $47,15 \pm 7,58\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $53,65 \pm 4,25\%$ ). Auch hier ergab sich die Differenz aus der Verschiebung von mittelstark oxidativen Fasern hin zu stärker oxidativen Fasern (Abb. 31).

Wenig oxidative Fasern waren im TA bei allen drei Genotypen relativ gering vertreten und trugen kaum zu den Verschiebungen bei ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $1,59\% \pm 1,45$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $3,40 \pm 1,91\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $2,17 \pm 0,52\%$ ) (Abb. 31 A).

Im Diaphragma war die Verschiebung hin zu einem höheren Anteil an stärker oxidativen Fasern in den homozygoten Knockoutmäusen deutlicher ausgeprägt als im TA (Abb. 31 B). Während Kontrollmäuse und heterozygote Tieren vergleichbare Anteile an Fasern mit einem stärker oxidativen Stoffwechsel aufwiesen, war der Anteil an Fasern mit stärker oxidativem Stoffwechsel in den homozygoten Knockoutmäusen um etwa 18% gegenüber den Kontrollmäusen nicht-signifikant erhöht. Verglichen mit den heterozygoten Mäusen ist dieser um etwa 20% ebenfalls nicht-signifikant erhöht ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $27,10\% \pm 5,14$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $25,04 \pm 5,96\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $44,89 \pm 10,18\%$ ). Gleichzeitig verringerte sich der Anteil an Fasern mit einem mittelstarken oxidativen Stoffwechsel in den homozygoten Mäusen gegenüber den Kontrollmäusen statistisch signifikant ( $p = 0,016$ ) um ca. 18% und in den heterozygoten Tieren gegenüber den homozygoten Mäusen ebenfalls signifikant ( $p = 0,034$ ) um etwa 20% ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $69,89 \pm 3,81\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $72,31 \pm 3,59\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $51,51 \pm 7,03\%$ ). Auch hier ergab sich die Differenz aus der Verschiebung von mittelstark oxidativen Fasern hin zu stärker oxidativen Fasern (Abb. 31). Wenig oxidative Fasern waren auch im DIA bei allen drei Genotypen relativ selten und trugen zu den Verschiebungen wenig bei ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ :  $3,01 \pm 2,01\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{+/-}$ :  $11,21 \pm 11,66\%$ ;  $dys^{-y}/chip^{-/-}$ :  $3,71 \pm 3,00\%$ ) (Abb.31 B).



**Abb. 31: Oxidative Eigenschaften der Muskelquerschnitte von Mäusen der Inzuchtlinie.** Untersucht wurden die Muskelquerschnitte von *M. tibialis anterior* (A) und Diaphragma (B) von drei Monate alten männlichen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>ln</sub>-(schwarz), ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>ln</sub>-(grau) und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>ln</sub>-Mäusen (weiß) der Inzuchtlinie. Dabei wurde zwischen stark, mittel und wenig oxidativen Fasern unterschieden. Es wurden pro Gruppe die kompletten Muskelquerschnitte von  $n \geq 4$  Mäusen ausgewertet. ( $n_{dys^{-y}/chip^{+/+}} = 5$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{+/-}} = 5$ ,  $n_{dys^{-y}/chip^{-/-}} = 4$ ). Die Messwerte sind wiedergegeben als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung; Abweichung mit \*  $p < 0,05$ .

## 5 Diskussion

### 5.1 Präklinische Validierung zweier Carboanhydrase-Inhibitoren in der *mdx*-Maus

Insgesamt bestätigen die vorliegenden Ergebnisse den Nutzen von *C. elegans* als Modellorganismus für die Selektion, die Identifikation und die Charakterisierung potentieller pharmakologischer Wirkstoffe. In dieser Studie wurde das therapeutische Potential der Substanzklasse der Sulfonamide zur Behandlung von DMD untersucht.

#### 5.1.1 Wirkung von MTZ und DCPM auf *C. elegans*

Sulfonamide stellen starke Inhibitoren einiger Carboanhydrasen im Menschen dar (Supuran *et al.*,2003). Mittels RNAi Knockdown Experimenten konnte CAH-4 als Muskel-CA in *C. elegans* identifiziert werden, da die Inhibition der Transkription von *cah-4* über RNAi die Muskeldegeneration im dystrophen Wurm vergleichbar reduzieren konnte (Giacomotto *et al.*,2009). Darüber hinaus spiegelt die *cah-4* Inhibition im *C. elegans* Modell den Effekt einer Sulfonamidbehandlung am besten wieder. Dies spricht dafür, dass diese Substanzen auf CAH-4 in *C. elegans* wirken (Giacomotto *et al.*,2009). Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die Verbesserung des degenerativen Phänotyps im Dystrophin-defizienten *C. elegans* Modell auf einer Inhibition der CAH-4 Aktivität durch Sulfonamide beruht. Obwohl es formell nicht gezeigt wurde, ist es wahrscheinlich, dass Sulfonamide direkt auf die Muskulatur wirken. Dafür sprechen folgende Gründe: (a) die Substanzen schränkten die Fortbewegung des *dys-1*- und Wildtyp-Wurms nicht ein, was darauf hinweist, dass sie keinen Effekt auf das Zentralnervensystem haben. (b) RNAi ist nur schwach im Nervensystem von *C. elegans* wirksam (Kennedy *et al.*,2004).

#### 5.1.2 Wirkung von MTZ und DCPM auf das *mdx*-Mausmodell

Trotz der Tatsache, dass sich die Muskelpathologie einer Dystrophindefizienz zwischen *mdx*-Mausmodell und humanen Patienten unterscheiden, stellt das *mdx*-Mausmodell dennoch das wichtigste Tiermodell für präklinische Studien in der DMD Forschung dar (Spurney *et al.*,2009; Willmann *et al.*,2009). Die vorliegende Arbeit umfasst Methoden für präklinische Untersuchungen der DMD, wie die isometrische Muskelkraftmessung am isolierten Muskel und histologische Untersuchungen. Die histologischen Parameter wie der Anteil an Fasern mit

zentral lokalisierten Kernen und der Variationskoeffizienten (VC) der Fasergröße spiegeln Degenerations- und Regenerationsprozesse wieder.

Die histologische Analyse des TA Muskels lieferte eine statistisch signifikante Abnahme des Anteils an Fasern mit zentralen Zellkernen in den mit 5x MTZ behandelten Mäusen. Dies lässt auf weniger Degenerations- und Regenerationsvorgänge während der Behandlungsperiode schließen. Dem gegenüber zeigte die automatisierte histologische Analyse des TA jedoch eine Erhöhung der Fasergrößenvariabilität in der 5x MTZ-Behandlungsgruppe, welche bei einer einfachen visuellen Kontrolle der entsprechenden HE-gefärbten Schnitte nicht offensichtlich ist. Die Erhöhung der Fasergrößenvariabilität spräche indessen für eine Zunahme an Degenerations- und Regenerationsvorgängen. Eine detaillierte Analyse der Fasergrößenverteilung zeigte, dass in der Gruppe der 5x MTZ-behandelten Tiere mehr kleinere und größere Fasern, die typischerweise während Regenerations- und Degenerationszyklen auftreten, vorkommen. Diese beobachtete, höhere Anzahl kleiner Fasern wurde durch die Färbung regenerierender Fasern mittels des Neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) bestätigt, da hier mehr NCAM-positive Fasern in der 5x MTZ behandelten Gruppe auftraten (siehe Abb. 14).

Das Diaphragma stellt den am stärksten betroffenen Muskel der *mdx*-Mäuse dar. In dieser Arbeit konnte die Behandlung der *mdx*-Mäuse mit 5x MTZ die histologischen Parameter des Diaphragmas nicht verbessern. Möglicherweise ist der Schaden aufgrund der Dystrophindefizienz im Diaphragma zu groß, als dass er durch die Behandlung, wie sie in dieser Studie angewandt wurde, abgemildert werden kann. Außerdem könnte der Behandlungsbeginn, der hier gewählt wurde, zu spät erfolgt sein, um eine Verbesserung für das Diaphragma zu bewirken. Die Behandlung wurde erst in einem Alter von 70 Tagen begonnen. Zu diesem Zeitpunkt hat jedoch in *mdx*-Mäusen bereits eine starke degenerative und regenerative Aktivität im Skelettmuskel stattgefunden (Carnwath *et al.*, 1987; Torres *et al.*, 1987; Coulton *et al.*, 1988).

Neben der histologischen Untersuchung der Muskeln wurde eine funktionelle Analyse, die Muskelkraftmessung des Extremitätenmuskels *M. extensor digitorum longus*, durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen *mdx*- und Wildtyp-Mäusen sind dabei leichter in älteren Mäusen zu beobachten (McKenna *et al.*, 2006). Die Daten der Muskelkraftmessung der mit den Carboanhydrase-Inhibitoren DCPM und MTZ mit hoher Dosierung behandelte Tiere zeigten eine Erhöhung sowohl der spezifischen tetanischen Kraftentwicklung als auch des Kraftabfalls in jeweils der behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 16 und 17). Betrachtet man im Falle der Behandlung mit DCPM nur den rechten EDL so erhielt man eine signifikante Abweichung zwischen den beiden Gruppen (Abb. 16 C). Die Zunahme der Muskelkraft beruht dabei nicht auf Unterschiede im Muskelgewicht oder der Muskelgröße, da eine Normalisierung

des isolierten Muskels in Hinblick auf diese beiden Parameter erfolgte. Die spezifische Kraftentwicklung, jedoch nicht die Resistenz des Muskels gegenüber einem Ausdauerprotokoll, wurde erhöht.

Als Erklärung für den erhöhten Kraftabfall, was einer Verschlechterung der Resistenz des Muskels gegenüber Ermüdung bedeutet, ist ein molekularer Mechanismus denkbar, bei dem eine Verstärkung der degenerativen Prozesse aufgrund erhöhter  $[Ca^{2+}]_i$  eintritt.

Generell konnte in *mdx*-Mäusen in Folge einer Stimulation eine erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  (Allen *et al.*, 2010) nachgewiesen werden. Dieser Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  kann durch die Gabe von Carboanhydrase-Inhibitoren vermutlich noch erhöht werden. So diskutiert Wetzel *et al.*, dass die CAs außerhalb des sarkoplasmatischen Retikulums  $H^+$ -Ionen durch das  $CO_2-HCO_3^{2-}$ -Puffersystem bilden. Diese Ionen treiben den gekoppelten  $Ca^{2+}-H^+$  bidirektionalen Transport durch die SR-Membran an und somit auch die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR. Die Katalyse der umgekehrten Reaktion bewirkt dagegen die Wiederaufnahme des  $Ca^{2+}$  ins SR (Wetzel *et al.*, 2002a). Jedoch kann das  $CO_2-HCO_3^{2-}$ -Puffersystem diese Aufgabe nur ausführen, wenn es durch die CA katalysiert wird. Die Halbwertszeit der unkatalysierten Reaktion beträgt etwa 7 s und ist zu langsam, um die schnelle Kinetik der  $Ca^{2+}$ -Ströme zu erklären. Die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung dauert nur 20–50 ms, während die  $Ca^{2+}$  Wiederaufnahme nur 200–300 ms dauert (Wetzel *et al.*, 1990). Bruns *et al.* wiesen eine Beschleunigung der  $CO_2-HCO_3^{2-}$ -Reaktion um das ~1000-fache durch die SR-CA nach (Bruns *et al.*, 1986).

Die Inhibition der CAs durch Sulfonamide verursachte eine Verlangsamung der  $Ca^{2+}$ -Freisetzung vom SR, aber auch eine Verlangsamung der Wiederaufnahme von  $Ca^{2+}$  in das SR, was bei einer ohnehin schon erhöhten  $[Ca^{2+}]_i$  die Verweildauer des  $Ca^{2+}$  in der Muskelzelle verlängert. Diese erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  könnte ursächlich für degenerative Prozesse und die Erniedrigung der Membranstabilität sein, welche zu einer geringeren Resistenz gegenüber Muskelermüdung führen können, wie sie in der Gruppe der mit CA-Inhibitoren behandelten *mdx*-Mäuse beobachtet wurde. Dabei können verschiedene Mechanismen diskutiert werden. Es scheint, dass die erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  zur Aktivierung der Phospholipase  $A_2$  führt, welche die Permeabilität der Membran heraufsetzt. Eine weitere Möglichkeit stellt die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) dar, welche Membranlipide peroxidieren. Dazu muss aber erst eine bestimmte  $[Ca^{2+}]_i$  erreicht sein, was mehrere Minuten dauert (Allen *et al.*, 2010). Jedoch erstreckt sich die isometrische Muskelkraftmessung in der vorliegenden Arbeit über etwa 45 min pro Muskel. Die Zunahme reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aktiviert zudem den NF- $\kappa$ B Signalweg, welcher Entzündungsprozesse, Fibrose und den Proteinabbau stimuliert (Allen *et al.*, 2010).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass  $\mu$ -Calpain, eine  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Protease, eine erhöhte Aktivität im *mdx*-Muskel aufweist, was dieser Protease eine Rolle bei den degenerativen Prozessen der Erkrankung zuspricht (Spencer *et al.*,1995). Darüber hinaus intensiviert Calpain die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Leckkanäle (Turner *et al.*,1993) und erniedrigt die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Salamino *et al.*,1994). Zusammengenommen führen möglicherweise mehrere aufeinanderfolgende Ereignisse zu degenerativen Prozessen und somit zur Verschlechterung der Resistenz gegenüber Ermüdung des Muskels: erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, Anhäufung des  $\text{Ca}^{2+}$  und Aktivierung von Proteasen, Aktivierung der Phospholipase  $A_2$  und Zunahme von ROS, wodurch weiter der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom gesteigert wird. Die zuvor diskutierten histologischen Daten sprechen ebenfalls für die Annahme, dass in den MTZ- und DCPM-behandelten *mdx*-Mäusen degenerative Prozesse zugenommen haben.

Neben der Erniedrigung der Resistenz gegenüber Ermüdung, konnten wir auch eine Zunahme der mittleren spezifischen Kraftentwicklung in Folge eines tetanischen Reizes beobachten. In der Publikation von Wetzel *et al.* wurde gezeigt, dass die Behandlung isolierter Muskelbündel mit einem speziellen Inhibitor L-645151 oder 6-Ethoxyzolid das Maximalsignal der Kraft nach der Einzelreizung des EDL und des *M. soleus* in der Ratte erhöht (Wetzel *et al.*,2002b). Die Inhibition der CAs durch Sulfonamide verursacht eine Verlangsamung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung vom SR. Folglich ist die Freisetzung und Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  ebenso wie die Anstiegszeit der Einzelreize (Zunahme der Kraft) verlängert. Dies liefert eine plausible Erklärung für die Zunahme der spezifischen tetanischen Kraft durch die Gabe von CA-Inhibitoren, auch wenn in dieser Arbeit nicht die maximale Kraft nach einem Einzelreiz, sondern nach einem tetanischen Reiz betrachtet wird. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch keine Veränderung der Anstiegszeit in Folge eines Einzelreizes oder der  $T_{1/2}$ -Relaxationszeit beobachtet. Ein Grund liegt vermutlich darin, dass wir uns im *mdx*-Mausmodell befinden, in dem bereits eine erhöhte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  vorliegt (Allen *et al.*,2010). Dagegen wurden die Untersuchungen von Wetzel und Kollegen in der Ratte durchgeführt.

### 5.1.3 Fazit und Ausblick

Für die analysierten Substanzen DCPM und MTZ konnte eine Wirksamkeit auch in der *mdx*-Maus gezeigt werden. Neben der Abnahme der Resistenz der Muskelfasern gegenüber exzentrischen Kontraktionen wurde auch eine Zunahme der spezifischen tetanischen Muskelkraft nachgewiesen. Dabei besitzt MTZ das bessere Profil, da hier der mittlere Kraftabfall weniger stark ausgeprägt ist und ähnlich dem der Kontrollgruppe ist. Dies beweist, dass ein *C. elegans* Screen gekoppelt mit einer Validierung im Mausmodell zur Identifikation und Charakterisierung

potentieller Medikamente gegen seltene Krankheiten sinnvoll ist. Unterschiede bezüglich der Ziel-CA und der Modellphysiologie bedingen wahrscheinlich unterschiedliche Ergebnisse in den verschiedenen Modellen und müssen immer berücksichtigt werden. Für Sulfonamide wie MTZ und DCPM werden wahrscheinlich keine weiteren präklinischen Untersuchungen für die Behandlung von DMD erfolgen. Jedoch kann die Entwicklung von isoenzymspezifischen oder zumindest organspezifischen CA-Inhibitoren erfolgversprechend sein, um deren Wirksamkeit zur Behandlung von DMD zu verbessern.

## 5.2 Entwicklung eines neuen Mausmodells (*dys*<sup>-/-</sup>/*chip*<sup>-/-</sup> bzw. *dys*<sup>-y</sup>/*chip*<sup>-/-</sup>)

Für eine Vielzahl von Erkrankungen beim Menschen gibt es bereits ein entsprechendes Mausmodell, so auch für die Duchenne Muskeldystrophie. Der Phänotyp der *mdx*-Maus ist zwar vergleichsweise schwach ausgeprägt, jedoch stellt dieses Modell immer noch das wichtigste Modell für diese Erkrankung dar (Gillis, 1999). Ansätze für eine Therapie der Duchenne Muskeldystrophie können in diesem Tiermodell auf unterschiedlichste Art und Weise getestet werden. So können wirksame Substanzen über die Nahrung verabreicht oder per Injektion in die Maus eingebracht werden. Darüber hinaus kann auch direkt auf genetischer Ebene eingegriffen werden. Zur Genmodifikation zählen die gezielte Abschaltung einzelner Gene, sowie das gezielte Einbringen arteigener oder artfremder Gene.

### 5.2.1 Zucht der Knockoutmutante (*dys*<sup>-/-</sup>/*chip*<sup>-/-</sup> bzw. *dys*<sup>-y</sup>/*chip*<sup>-/-</sup>)

In dieser Arbeit sollte ein Therapieansatz auf genetischer Ebene getestet werden. Ziel war es einen vollständigen Knockout des *chip*-Gens im genetischen Hintergrund der *mdx*-Maus zu erzeugen, um das therapeutische Potential dieses Gens und des daraus resultierenden Verlust des CHIP (carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein)-Proteins zu prüfen. Dabei sollte der Knockout nicht direkt in der *mdx*-Maus gentechnisch durchgeführt werden, sondern über eine Kreuzung (Hybridzucht) einer heterozygoten *chip*-Knockout Maus mit *mdx*-Mäusen.

Die Etablierung der *dys*<sup>-y</sup>/*chip*<sup>-/-</sup>- bzw. *dys*<sup>-/-</sup>/*chip*<sup>-/-</sup>-Knockoutmäuse war nur mit Einschränkungen erfolgreich, da homozygote Knockoutmäuse eine hohe peri- und postnatale Sterblichkeit aufwiesen. Dabei konnten homozygote Knockoutmäuse nur in der Inzuchtlinie erzeugt werden. Die Auszuchtlinie lieferte keine Tiere mit vollständigem *chip*-Knockout. Die wenigen homozygoten Knockoutmäuse waren schon bei der Geburt kleiner und leichter als die Wurfgeschwister der beiden anderen Genotypen. Dieses Defizit konnte auch nicht mehr aufgeholt werden. Die wenigen überlebenden homozygoten Knockouttiere erreichten auch nur ein geringes Lebensalter, weshalb die Experimente im Alter von drei Monaten durchgeführt wurden. Die Arbeitsgruppe um Cam Patterson beobachtete in den *chip*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine erhöhte Sterblichkeit (Zhang *et al.*, 2005). Cam Patterson und Kollegen erkannten, dass CHIP als Cochaperon/Ubiquitinligase mit Hsp70 interagiert und dabei die Rückfaltung von stressgeschädigten Proteinen *in vivo* erhöht (Kampinga *et al.*, 2003). CHIP besitzt Ubiquitinligaseaktivität und führt zum Proteasom-abhängigen Abbau irreversibel geschädigter Proteine, wodurch deren zelluläre Toxizität unterbunden wird (Connell *et al.*, 2001; Demand *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2001). Bei CHIP handelt es sich auch um einen physiologischen

Regulator der stressabhängigen Apoptose (J. Huang und C. Patterson, unveröffentlichte Beobachtungen). Des Weiteren induziert CHIP die Trimerisierung und transkriptionelle Aktivierung des Heat shock factor 1. Dieser stellt den Hauptregulator der Hitzeschockantwort auf Transkriptionsebene dar. Daher ist CHIP für die maximale Hsp70 Induktion in allen Geweben von Bedeutung (Dai *et al.*, 2003). CHIP spielt somit als Cochaperon und E3/E4-Ligase in Prozessen der Stressantwort eine wichtige Rolle.

Die Rolle von CHIP macht deutlich, dass ein vollständiger Knockout entscheidend in die Stressantwort und damit verbunden in andere physiologische Prozesse eingreift. Dies scheint in den homozygoten Knockouttieren dazu zu führen, dass diese nur eingeschränkt lebensfähig sind. So stellt die Geburt für den Organismus eine große Stresssituation dar, welche für die Mäuse mit fehlendem CHIP nur schwer zu bewältigen ist, wodurch diese schon während der Geburt sterben können. Auch die körperliche Schwäche der homozygoten Knockouttiere lässt sich auf die wesentliche Rolle von CHIP in der Stressantwort zurückzuführen.

Zusätzlich zu den Mäusen, die während der Geburt starben ist es denkbar, dass es auch zu einer Pädophagie durch die Elterntiere kommt. Vor allem das Männchen stellt hierfür ein Risiko dar, weshalb wir die Männchen versuchsweise nach der Befruchtung aus den Zuchtkäfigen entfernt haben. Dies führte jedoch zu keiner Verbesserung bezüglich der Überlebensrate, was dafür spricht, dass auch das Muttertier die Jungtiere töten kann, welche es für lebensunfähig oder zu schwach erachtet. In einem weiteren Versuch wurden daher Ammen eingesetzt, welchen möglichst bald nach der Geburt der vollständige Fremdwurf zum eigenen Wurf gegeben wurde. Aber auch hier konnte keine Verbesserung erreicht werden. Es ist anzunehmen, dass der Großteil der homozygoten Knockouttiere aufgrund einer Kombination von perinataler Sterblichkeit, Pädophagie oder infolge der Verdrängung durch gesunde oder weniger beeinträchtigte Geschwister starb.

Den wenigen überlebenden homozygoten Knockouttieren der Inzuchtlinie standen dagegen keine überlebenden homozygoten Knockouttiere in der Auszuchtlinie gegenüber. Der Grund hierfür lag wahrscheinlich im unterschiedlichen Vorgehen bei der Zucht. Generell ist im Falle einer Hybridzucht zu beobachten, dass die F1-Generation sehr robust ist (Heine, 1998). Die späteren Generationen sind jedoch weniger robust. In der vorliegenden Arbeit wurde der Auszuchtansatz als erstes verfolgt. Da keine homozygoten Knockoutmäuse erzeugt werden konnten, wurden die Experimente zunächst mit *dys<sup>-y</sup>/chip<sup>+/-</sup>*-Mäusen und den entsprechenden *dys<sup>-y</sup>/chip<sup>+/+</sup>*-Kontrollmäusen der Alterstufen drei, sechs und zwölf Monate durchgeführt. Parallel wurde auch ein Inzuchtansatz verfolgt. Hier wurde bei der Kreuzung eines *chip<sup>+/-</sup>*-Männchens mit weiblichen *mdx*-Mäusen in der Parentalgeneration begonnen. Die Jungtiere der F1- und der weiteren

Generation wurden nur mit Geschwistertieren weiterverpaart. In der F2- und F3-Generation konnten dann auch homozygote Knockoutmäuse identifiziert werden. In späteren Generationen war dies nicht mehr der Fall. Der Grund dafür, dass nur die Inzuchtlinie im Gegensatz zum Auszuchtansatz homozygote Knockoutmäuse erzeugen konnte, liegt vermutlich darin, dass im Inzuchtansatz die F2- und F3-Nachkommen der Hybridzucht noch robuster waren. Dafür spricht auch die Tatsache, dass ab der F4-Generation keine homozygoten Knockoutmäuse mehr geboren wurden.

### 5.2.2 Funktionelle und biochemische Charakterisierung der Knockoutmutante

Das Fehlen von Dystrophin führt im Menschen, ebenso wie in der *mdx*-Maus, zu einer Störung der Membranintegrität des Sarkolems (Mokri *et al.*,1975; Weller *et al.*,1990; Menke *et al.*,1991; Clarke *et al.*,1993; Petrof *et al.*,1993; Matsuda *et al.*,1995; Straub *et al.*,1997a; Duclos *et al.*,1998; Cote *et al.*,1999), zur Auflösung von Costameren (Minetti *et al.*,1992; Porter *et al.*,1992; Minetti *et al.*,1994; Ehmer *et al.*,1997; Williams *et al.*,1999), zu Muskelschwäche (Carlson *et al.*,1990; Cox *et al.*,1993) und Nekrose (Torres *et al.*,1987).

Im Skelettmuskel liegt Dystrophin assoziiert in einem oligomeren, transsarkolemmalen Proteinkomplex vor. Dieser umfasst Proteine, wie Dystroglykane, Sarkoglykane, Dystrobrevine, Syntrophine und Sarcospan (Straub *et al.*,1997a) und verbindet Aktin im Sarkomer mit Laminin-2 der extrazellulären Matrix der Muskelfasern (Ervasti *et al.*,1993). Es wird angenommen, dass eine wichtige Funktion des Dystrophin-Glykoproteinkomplex (DGC) darin besteht, das Sarkolemm mechanisch gegenüber Scherkräften zu stabilisieren, welche während einer exzentrischen Kontraktion des Muskels auftreten (Petrof *et al.*,1993).

Der *mdx*-Muskel weist eine erhöhte Anfälligkeit für Verletzungen während wiederholten Kontraktionen mit gleichzeitiger Verlängerung des Muskels auf (Head *et al.*,1992; Moens *et al.*,1993; Petrof *et al.*,1993; Deconinck *et al.*,1996; Deconinck *et al.*,1997b; Brooks,1998; Gillis *et al.*,1998).

In dieser Arbeit wurde die isometrische Muskelkraftmessung eingesetzt, um den Einfluss des partiellen und vollständigen Knockouts von *chip* im *mdx*-Hintergrund auf die Kraftentwicklung und die Resistenz gegenüber Muskelermüdung zu untersuchen.

In der isometrischen Muskelkraftmessung zeigten beide Zuchtlinien für die auf die CSA normierte maximale tetanische Kraft (spezifische tetanische Kraft) keinen signifikanten Unterschied zwischen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In/Aus</sub>-Kontrolle und den Tieren mit partiellem bzw. vollständigem *chip*-Knockout (siehe Tabelle 1 und 2, Abbildungen 20 B und 21 B). Jedoch beobachtete man für den Kraftabfall nach exzentrischer Kontraktion eine Verbesserung der

Resistenz gegenüber einer Muskelermüdung in den ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>In/Aus</sub>-Mäusen und in den ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Mäusen (siehe Tabelle 1 und 2, Abbildungen 20 A und 21 A). Die Verringerung des Kraftabfalls zwischen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>Aus</sub>-Mäusen und ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>Aus</sub>-Mäusen lag in der Auszuchtlinie zwischen 6,5% und 20% in den unterschiedlichen Altersgruppen (siehe Tabelle 1). Zwischen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>-Mäusen und ( $dys^{-y}/chip^{+/-}$ )<sub>In</sub>-Mäusen der Inzuchtlinie beobachtete man sogar eine signifikante Verringerung des Kraftabfalls um etwa 26% und zwischen ( $dys^{-y}/chip^{+/+}$ )<sub>In</sub>-Mäusen und ( $dys^{-y}/chip^{-/-}$ )<sub>In</sub>-Mäusen der Inzuchtlinie um 38%.

Zur Begründung der Ergebnisse der isometrischen Muskelkraftmessung können verschiedene Ansätze diskutiert werden: (1) Die Verbesserung der Sarkolemmintegrität durch Stabilisierung des DGC gegenüber dem proteasomalen Abbau und/oder kompensatorischer Expression und Einbau von Utrophin in den DGC, (2) die Verbesserung der Sarkolemmintegrität durch Stabilisierung oder Verstärkung des zweiten, das Zytoskelett und die extrazelluläre Matrix verbindenden Komplexes, des  $\alpha7\beta1D$  Integrin-Komplexes, (3) ein Einfluss des *chip* Knockouts auf die Myofibrillogenese über den Spiegel von UNC-45 und (4) ein veränderter Metabolismus in Richtung eines langsamen oxidativen Fasertyps.

Um Hinweise auf den zugrunde liegenden Mechanismen zu erhalten, wurde auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse die relative Proteinexpression von  $\alpha$ -Dystroglykan,  $\alpha$ -Aktinin-2, Calsarcin-2, Myogenin, p53 und Utrophin in den Inzuchttieren untersucht, da hier die stärkeren Effekte gesehen wurden.

$\alpha$ -Dystroglykan ist eine Komponente des DGC, während  $\alpha$ -Aktinin-2 einen Bestandteil des  $\alpha7\beta1D$  Integrin-Komplexes darstellt. Neben dem DGC, stabilisiert auch der  $\alpha7\beta1D$  Integrin-Komplex das Sarkolemm, indem es die extrazelluläre Matrix (ECM) und das Zytoskelett verbindet (von der Mark *et al.*, 1991; Song *et al.*, 1992; Song *et al.*, 1993; Hodges, 1996). Als Teil des  $\alpha7\beta1D$  Integrin-Komplex an der Z-Scheibe vernetzt  $\alpha$ -Aktinin-2 Aktinfilamente und ist ein wichtiger Bestandteil der Z-Scheibe (Beggs *et al.*, 1992).

Im Skelettmuskel fungieren  $\alpha$ -Dystroglykan im DGC und  $\alpha7\beta1D$  Integrin im Integrin assoziierten Komplex als Teil von Costameren als Rezeptoren für Laminin- $\alpha2$  (Colognato *et al.*, 2000; Yurchenco *et al.*, 2004). Costamere stellen eine subsarkolemmale Anordnung von Proteinen dar, welche, ausgerichtet an der Z-Scheibe, die Sarkomere an das Sarkolemm koppeln (Ervasti, 2003). Street (Street, 1983), Craig und Kollegen (Pardo *et al.*, 1983) sowie Sanger und Kollegen (Danowski *et al.*, 1992) nahmen an, dass Costamere die kontraktile Kraft lateral vom Sarkomer über das Sarkolemm zur ECM übertragen. Diese Bereiche lateraler Kraftübertragung über das Sarkolemm müssen mechanisch verstärkt sein, um die Beanspruchung für die relativ schwache Lipiddoppelschicht während der Kontraktion und Dehnung zu minimieren und die

Sarkomerintegrität zu erhalten. Burkin *et al.*, 2001 konnten zeigen, dass eine erhöhte Expression von  $\alpha7\beta1$  Integrin zu einer Verbesserung der Muskeldystrophie in  $mdx/utr^{-/-}$ -Mäusen führt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Modulation der  $\alpha7\beta1$  Integrin-vermittelten Assoziation der Muskelzellen mit der extrazellulären Matrix die Symptome der Muskeldystrophie abmildern und kompensatorisch auf das Fehlen von Dystrophin und Utrophin wirken kann.  $\alpha$ -Aktinin-2, sollte hier als Marker für den Gehalt des  $\alpha7\beta1$  Integrin-Komplex dienen. Weiterhin sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob  $\alpha$ -Dystroglykan als repräsentatives Protein des DGC, durch den partiellen und vollständigen Knockout von *chip* im *mdx*-Hintergrund stabilisiert wird und somit nicht über das Proteasom abgebaut wird. Dieser Ansatz greift auf Ergebnisse von Ohlendieck und Kollegen zurück. Diese zeigten für das Sarkolemm aus *mdx*-Mäusen eine Reduktion der Proteine des DGC um etwa 80-90% als Konsequenz für das Fehlen von Dystrophin (Ohlendieck *et al.*, 1991). Die Reduktion beruht nicht auf einer geringeren Synthese dieser Proteine, sondern darauf, dass diese Proteine nicht richtig zusammengesetzt und/oder im Sarkolemm integriert wurden oder in der Abwesenheit von Dystrophin abgebaut wurden (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992). Jedoch konnte bislang nicht nachgewiesen werden, ob die Komponenten des DGC Zielproteine für die Ubiquitinierung durch CHIP darstellen. Neben  $\alpha$ -Dystroglykan wurde auch die relative Expression von Utrophin ermittelt, um zu untersuchen, ob eine verringerte proteosomale Degradation zur Erhöhung dieses kompensatorischen Proteins führt, wodurch anstelle des Dystrophin-Glykoproteinkomplexes (DGC) der Utrophin-Glykoproteinkomplex (UGC) gebildet werden könnte, der die Integrität des Sarkolemmas ebenfalls wiederherstellen kann.

Weder für  $\alpha$ -Dystroglykan noch für Utrophin wurden in dieser Arbeit signifikante Unterschiede in der relativen Expression zwischen den verschiedenen Genotypen der beiden Zuchtlinien gefunden (siehe Abb. 25). Dies spricht dafür, dass es zu keiner nennenswerten Reorganisation des DGC gekommen ist oder dass Utrophin kompensatorisch für die Dystrophin-Defizienz in den transsarkolemmalen Proteinkomplex eingebaut wurde, was zu einer Verbesserung der Sarkolemmstabilität geführt hätte.

Dagegen konnte im *M. extensor digitorum longus* und im Diaphragma in  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$ -Mäusen und in  $(dys^{-y}/chip^{-/-})_{In}$ -Mäusen gegenüber der Kontrolle  $(dys^{-y}/chip^{+/+})_{In}$  eine signifikant erhöhte relative Expression von  $\alpha$ -Aktinin-2 nachgewiesen werden (siehe Abb. 23). Somit finden sich Hinweise, dass die Expression von  $\alpha$ -Aktinin-2 direkt oder indirekt von der vorhandenen Menge an CHIP abhängen kann.  $\alpha$ -Aktinin-2 wird sehr früh während der Myofibrillogenese in Premyofibrillen organisiert (Stout *et al.*, 2008) und kann daher auch als Marker für die Myofibrillogenese gesehen werden. UNC-45 spielt eine wichtige Rolle bei der

Myofibrillogenese. Bei UNC-45 handelt es sich um ein Myosin-Chaperon und ein Hsp90 Co-chaperon, welches ein Zielprotein für die Ubiquitinierung durch CHIP darstellt. CHIP greift somit bei der Regulation des Abbaus von UNC-45 ein. Für eine normale Myofibrillenorganisation ist eine genaue Regulation der UNC-45b-Expression von wesentlicher Bedeutung (Landsverk *et al.*,2007; Bernick *et al.*,2010). Bernick *et al.*, 2010 zeigten im Zebrafisch, dass eine Überexpression von UNC-45b ebenso wie der Knockdown zu einer fehlerhaften Myofibrillenorganisation führt. In der vorliegenden Arbeit betrachten wir jedoch ein Mausmodell mit *mdx*-Hintergrund. Dystrophin spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Membranzytoskelettorganisation im normalen Muskel. Das Fehlen von Dystrophin führt zur Störung dieser Organisation (Williams *et al.*,1999). Ob in unserem Mausmodell aufgrund des *chip*-Knockouts UNC-45b vermehrt vorliegt und wie sich dies im *mdx*-Hintergrund auswirkt, kann hier nicht abschließend beantwortet werden. Dennoch ist aufgrund der bekannten Wechselwirkung zwischen CHIP und UNC-45b von einem Einfluss der CHIP-Reduktion auf den Gehalt an UNC-45b und die Myofibrillogenese auszugehen. Entsprechend dieser Ausführungen besteht zum einen die Möglichkeit, dass  $\alpha$ -Aktinin-2 ein direktes Zielprotein für die Ubiquitinierung durch CHIP und den anschließenden proteasomalen Abbau darstellt, zum anderen ist es denkbar, dass CHIP indirekt über die Regulation der Menge an UNC-45b den Einbau von  $\alpha$ -Aktinin-2 in die Z-Scheibe der Myofibrillen steuert. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die erhöhte Expression von  $\alpha$ -Aktinin-2 durch eine gesteigerte Akt-Aktivität verursacht wird. Für mehrere E3 Ligasen, als solche CHIP, stellt Akt nachweislich ein Substrat für die Ubiquitinierung und den proteasomale Abbau dar (Dickey *et al.*,2008). Blaauw *et al.* zeigten in *mdx* Mäusen, welche ein induzierbares, aktiviertes Akt besaßen, dass die erhöhte Aktivität von Akt zu einem Kraftabfall in Folge einer ekzentrischen Kontraktion führte, welcher dem von Wildtypmäusen gleicht (Blaauw *et al.*,2008). Mikroarray und PCR Analysen weisen darauf hin, dass eine Akt-Aktivierung zu einer Hochregulierung von Genen führt, die für Z-Scheibe und Costamer assoziierte Proteine kodieren (Blaauw *et al.*,2008), was eine erhöhte  $\alpha$ -Aktinin-2 Expression erklären könnte. Mehr noch verursachte die systemische Verabreichung von IGF-1 eine Verschiebung hin zu einem stärker oxidativen Fasertypzusammensetzung und einem verringerten Kraftabfall nach Kontraktion in *mdx* Mäusen (Schertzer *et al.*,2006). Die bisherigen Ausführungen weisen darauf hin, dass eine verstärkte Aktivität des IGF-1/PI3K/Akt Signalweges und eine erhöhte Expression von  $\alpha$ -Aktinin-2 den dystrophen Phänotyp verbessern können. Ob und über welchen Mechanismus die Aktivität des IGF-1/PI3K/Akt Signalweges erhöht wurde und ob damit ein Einfluss auf den  $\alpha$ -Aktinin-2-Spiegel besteht, kann hier nur spekuliert werden. Zur Aufklärung sind

weiterführende Experimente nötig, die die  $\alpha$ -Aktinin-2-Funktion im Skelettmuskel eingehender analysieren. Hier soll nun versucht werden darzulegen, wie eine erhöhte Expression des  $\alpha$ -Aktinin-2 das Sarkolemm stabilisieren und verstärken kann bzw. worauf die verbesserte Resistenz gegenüber einer Ermüdung beruhen könnte. Erkenntnisse aus verschiedenen anderen Mausmodellen sollen dazu herangezogen werden. Die Skelettmuskelisoformen  $\alpha$ -Aktinin-2 und -3 wurden lange Zeit vornehmlich als Strukturproteine betrachtet (Beggs *et al.*,1992). Jedoch handelt es sich bei  $\alpha$ -Aktinin um ein Protein mit multiplen Funktionen, welches neben der Bündelung von Aktinfilamenten auch eine vielseitige Plattform für verschiedene Proteininteraktionen darstellt. Neben der Funktion als Strukturproteine interagieren  $\alpha$ -Aktinin-2 und -3 auch mit einer Reihe von Membran-, Signal- und Stoffwechselproteinen (MacArthur *et al.*,2004). Sarkomerische  $\alpha$ -Aktinine spielen eine Rolle für die Regulation bezüglich der Anzahl, Lokalisation und Aktivierungsschwelle verschiedener Sensoren (Itoh-Satoh *et al.*,2002; Mohapatra *et al.*,2003; Gehmlich *et al.*,2004). Die Veränderungen dieser Sensoren in der Z-Scheibe könnten möglicherweise ein phänotypisches Bild ähnlich dem Phänotyp der  $\alpha$ -Aktinin-3 Defizienz ergeben. Studien in *ACTN3* Knockoutmäusen zeigen eine Hochregulierung von  $\alpha$ -Aktinin-2 und eine erhöhte Muskelausdauer. Zusätzlich ist in isolierten Muskeln der *ACTN3* Knockoutmäuse eine längere Halbrelexationszeit und eine bessere Erholung von Ermüdung im Vergleich zu Wildtypmäusen zu beobachten (Chan *et al.*,2008). Auf molekularer Ebene konnte in den *ACTN3* Knockoutmäusen ein erhöhter Glykogengehalt nachgewiesen werden, während schnelle Fasern eine erniedrigte Aktivität der Enzyme des anaeroben Stoffwechselweges und eine stärkere Aktivität mitochondrialer Enzyme des oxidativen Stoffwechselweges besitzen (MacArthur *et al.*,2007; MacArthur *et al.*,2008). Diese Beobachtungen lassen eine Verschiebung zu einem langsamen oxidativen Muskelphänotyp vermuten, wobei keine Veränderung des Fasertypanteils in den KO-Mäusen gezeigt wurde. Gleichzeitig beobachtet man in diesen Tieren eine Verbesserung der Resistenz gegenüber Ermüdung. Die Hochregulierung von  $\alpha$ -Aktinin-2 kann gegebenenfalls die Stöchiometrie der Proteinkomplexe beeinträchtigen oder zu neuen Interaktionen mit  $\alpha$ -Aktinin-2 führen. Ähnlich wie für den *ACTN3* KO wurde auch in Calsarcin-2 Knockoutmäusen eine verbesserte Ausdauer beobachtet (Frey *et al.*,2008). Calsarcin (Cn) inhibiert und lokalisiert das Calcineurin an der Z-Scheibe über Interaktion mit  $\alpha$ -Aktinin-2 (Frey *et al.*,2000; Frey *et al.*,2004; Frey *et al.*,2008).  $\alpha$ -Aktinin-2 und Calcineurin besitzen eine überlappende Bindestelle am Calsarcin, um welche beide konkurrieren. Wenn nun die  $\alpha$ -Aktinin-2 Expression, wie in dieser Arbeit gezeigt, gesteigert ist, ist es denkbar, dass verstärkt  $\alpha$ -Aktinin-2 an Calsarcin-2 bindet und nicht

Calcineurin, wodurch dieses nicht durch Calsarcin-2 an der Z-Scheibe lokalisiert und inhibiert werden kann. Neben einer erhöhten  $\alpha$ -Aktinin-2 Expression kann auch eine verringerte oder fehlende Expression von Calsarcin-2, wie sie in den Calsarcin-2 Knockoutmäusen vorliegt, zur verstärkten Aktivierung des Calcineurin-Signalweges führen.

Der Calcineurin Signalweg ist essentiell für die Muskelregeneration (Sakuma *et al.*,2003; Sakuma *et al.*,2005). Calcineurin reguliert die Differenzierung der Myoblasten (Abbott *et al.*,1998), die Transkription und/oder Aktivierung von regulatorischen Faktoren und von Wachstumsfaktoren, z. B. MEF-2A, MyoD, Myogenin und Insulin-like IGF-I (Xu *et al.*,2002; Friday *et al.*,2003; Alfieri *et al.*,2007), die Fusion von Myoblasten zu Myofasern (Charge *et al.*,2003) und die Expression MHC-Isoformen (Rauch *et al.*,2005). Calcineurin reguliert auch die kontraktilen und metabolischen Eigenschaften der Skelettmuskulatur, indem es die Expression von Genen aktiviert, die spezifisch für langsame oxidative Fasern sind (Angus *et al.*,2005; Long *et al.*,2007).

Ein weiteres Protein, welches durch  $\alpha$ -Aktinin-2 an der Z-Scheibe lokalisiert wird, ist Atrogin-1/MAFbx. Dabei handelt es sich um eine E3 Ligase, welche den Calcineurin-Signalweg beeinflusst, indem es Calcineurin A (CnA) ubiquitiniert und dadurch für den Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System bestimmt (Li *et al.*,2004). Calsarcin bildet zusammen mit Atrogin-1 einen wichtigen Komplex zur Modulation des Calcineurin-Signalweges in der Z-Scheibe.  $\alpha$ -Aktinin besitzt am Atrogin-1 eine Interaktionsstelle, welche nahe am nukleären Lokalisationssignal (NLS) und der Calcineurin A Bindestelle liegt. Dies lässt vermuten, dass  $\alpha$ -Aktinin die Wechselwirkung des Atrogin-1 mit Calcineurin A und die Translokation des Atrogin-1 in den Zellkern regulieren kann. Im Zellkern bestimmt Atrogin-1 MyoD und Myogenin für den proteasomalen Abbau. Die erniedrigte Menge an Atrogin-1 ist ursächlich für eine geringere MyoD- und Myogenin-Degradation und eine erhöhte CnA Aktivität. Interessanterweise wurde Myogenin ebenfalls eine Rolle bei der Entwicklung eines oxidativen Faserphänotyps nachgewiesen (Hughes *et al.*,1999). So induziert Myogenin eine Verschiebung der Enzymaktivitäten von einem glykolytischen Stoffwechsel hin zu einem oxidativen Stoffwechsel im Muskel transgener Mäuse (Hughes *et al.*,1999). Die Menge an Atrogin-1 wird durch FOXO-Signalwege reguliert. FOXO3a wirkt auf den Atrogin-1-Promoter und führt zur Transkription von Atrogin-1 (Sandri *et al.*,2004). FOXO3a-induzierte Promoteraktivität wird direkt durch Hsp70 inhibiert (Senf *et al.*,2010), welches mit CHIP interagiert (Ballinger *et al.*,1999). Die Transkription von FOXO3 kann durch die Aktivierung von Akt gehemmt werden (Sandri *et al.*,2004). Zudem zeigten Belova *et al.* eine CHIP-vermittelte Regulation der SGK-1 Menge (Belova *et al.*,2006). Experimente in *Caenorhabditis elegans*

zeigten, dass SGK-1 einen wichtigen Vermittler des Insulinsignals via Phosphorylierung und Inaktivierung des FOXO3a Homologs DAF-16 (decay-accelerating factor 16) darstellt (Hertweck *et al.*,2004; Lamitina *et al.*,2005).

Aufgrund der oben geschilderten Zusammenhänge wurde in dieser Arbeit zusätzlich die relative Expression des Calsarcin-2 und Myogenin mittels Western Blot Analyse überprüft. Tatsächlich konnte im DIA ( $p > 0,05$ ) und EDL ( $p < 0,05$ ) eine Verringerung der Calsarcin-2 Expression in den homozygoten Knockoutmäusen der Inzuchtlinie gezeigt werden (Abb. 24). Dagegen ist die relative Expression des Myogenin im DIA sowohl der heterozygoten als auch der homozygoten Inzuchtmäuse signifikant erhöht. Im EDL ist die Myogeninexpression jedoch unverändert (Abb. 24). Da in Calsarcin-2-KO Mäusen ein verstärkt oxidativer Stoffwechsel in den Muskelfasern gezeigt wurde und da für Myogenin eine Induktion der Verschiebung der Enzymaktivitäten von einem glykolytischen Stoffwechsel hin zu einem oxidativen Stoffwechsel im Muskel nachgewiesen wurde, sprechen die Beobachtungen in den Knockoutmäusen in dieser Arbeit dafür, dass ein verstärkter oxidativer Stoffwechsels in den Muskelfasern dieser Tiere stattfindet und dies zum verbesserten Ausdauerphänotyp führen kann.

Neben  $\alpha$ -Aktinin-2, Calsarcin-2 und Myogenin ist auch p53 im Skelettmuskel an Mechanismen beteiligt, die auf den aeroben Metabolismus und damit auf die Muskelausdauer wirken. Es wurde nachgewiesen, dass p53 den aeroben Metabolismus und die Ausdauerbelastbarkeit fördert (Park *et al.*,2009).

Diese Zusammenhänge wurden in Studien, unter anderem in p53-defizienten Mäusen, gezeigt (Ibrahim *et al.*,1998; Papadopoulou *et al.*,1999; Bensaad *et al.*,2006; Chen *et al.*,2006; Matoba *et al.*,2006; Saleem *et al.*,2009). Interessanterweise ist p53 ein direktes Zielprotein für die Ubiquitinierung durch CHIP und einen dadurch induzierten proteasomalen Abbau (Esser *et al.*,2005). Aufgrund großer Standardabweichungen waren die Ergebnisse der Western Blot Analyse der relativen Expression von p53 nicht aussagekräftig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse aus der Western Blot Analyse einige Hinweise ergeben, welche in den untersuchten Muskeln stark für eine Verschiebung des Fasertyps hin zu einem erhöhten oxidativen Stoffwechsel sprechen. Um diesen Hinweisen weiter nachzugehen, wurde zusätzlich im DIA, TA und Sol der verschiedenen Genotypen der Inzuchtlinie der Anteil an Fasern mit schnellem (fMy) und langsamem Myosin-Typ (sMy) ermittelt und im DIA und TA ebenfalls noch eine SDH-Färbung durchgeführt. Die Ergebnisse werden nachfolgend diskutiert.

### 5.2.3 Histochemie und Immunhistologie

#### *Fasertypenkomposition und oxidativer Status der Muskelfasern in allen drei Genotypen der Inzuchtlinie*

Zur Klärung, ob der partielle und vollständige *chip*-KO einen Einfluss auf die Fasertypenzusammensetzung der Muskeln besitzt, wurden Muskelschnitte der Muskeln DIA, TA und Sol von Kontrollmäusen, heterozygoten Mäusen und homozygoten Knockoutmäusen der Inzuchtlinie in einer MHC-Doppelfärbung angefärbt. Im DIA und TA waren nur geringfügige Veränderungen zu erkennen. Im Sol waren diese Veränderungen deutlicher ausgeprägt, wenn auch relativ schwach. So lässt sich in allen drei Muskelgruppen ein statistisch nicht-signifikanter Trend hin zu einer Zunahme an Fasern des langsamen Myosintyps erkennen, wobei im Sol die Zunahme etwa 7% betrug (Abb. 30).

Die SDH-Färbung zeigte eindeutiger Ergebnisse. So beobachtete man im TA eine geringe Abnahme mittelstark-oxidativer Fasern, bei einer gleichzeitigen Zunahme stärker oxidativer Fasern von 6 bzw. 13% zwischen Kontrollmäusen und Knockoutmäusen bzw. Kontrollmäusen und heterozygoten Knockoutmäusen (Abb. 31 A). Diese Verschiebung von mittelstark-oxidativen Fasern hin zu stärker oxidativen Fasern lässt sich auch im DIA beobachten (Abb. 31 B), wobei diese hier stärker ausgeprägt ist. Die Ergebnisse sowohl der MHC-Doppelfärbung als auch aus der SDH-Färbung bekräftigen die Vermutung, dass aufgrund des *chip*-Knockouts eine Verschiebung des Stoffwechsels innerhalb der Muskelfasern zu einem stärker oxidativen Stoffwechsel stattgefunden hat, der den verbesserten Ausdauerphänotyp erklären kann. Der Grund hierfür liegt vermutlich in einer erhöhten Expression des  $\alpha$ -Aktinin-2 und dadurch möglicherweise bedingt, einer Verringerung an Calsarcin-2, das infolgedessen weniger den Calcineurin-Signalweg inhibiert. Hier soll nochmal auf Studien in *ACTN3* Knockoutmäusen bzw. in Calsarcin-2 Knockoutmäusen verwiesen werden, die zeigten, dass eine Hochregulierung von  $\alpha$ -Aktinin-2 bzw. ein Knockout von Calsarcin-2 mit einer erhöhten Muskelausdauer einhergingen (Chan *et al.*,2008; Frey *et al.*,2008). Auf molekularer Ebene konnte in den *ACTN3* Knockoutmäusen ein erhöhter Glykogengehalt nachgewiesen werden (MacArthur *et al.*,2007; MacArthur *et al.*,2008). In den Calsarcin-2 Knockoutmäusen wurde eine größere Anzahl an Typ IIa Fasern und Fasern, welche eine positive SDH-Färbung aufwiesen, aufgezeigt werden (Frey *et al.*,2008). Beide Studien führten diese Beobachtungen auf einen gesteigerten oxidativen Metabolismus in den Muskelfasern zurück. Die MHC- und die SDH-Färbungen konnten nicht im EDL durchgeführt werden, da dieser in Folge der Beanspruchungen der isometrischen Muskelkraftmessung nicht auszuwerten war. Aufgrund der hohen Sterblichkeit der homozygoten Knockoutmäuse konnte auch nicht auf entsprechende Muskeln anderer Tiere zurückgegriffen

werden. Jedoch zeigte die Western Blot Analyse auch im DIA eine erhöhte  $\alpha$ -Aktinin-2 bzw. eine erniedrigte Calsarcin-2 Expression.

*Weitere wichtige histopathologische Parameter einer Muskeldystrophie: Anteil an Fasern mit zentral lokalisiertem Zellkern, Fasergröße und Varianzkoeffizient und Anteil an fibrotischem Gewebe*

Normale Muskelfasern besitzen periphere Zellkerne und ein intaktes Sarkolemma. Dagegen finden sich in nekrotischen Muskeln eine Infiltration mit inflammatorischen Zellen und degenerierende Muskelfasern mit fragmentiertem Sarkoplasma. Regenerierende Nagermuskeln zeigen im späteren Verlauf Muskelfasern mit zentral lokalisierten Zellkernen (regenerierte Fasern). Zentrale Zellkerne sind eine charakteristische Eigenschaft regenerierter Nagermuskeln. In anderen Spezies, einschließlich des Menschen, wandern die Zellkerne wieder in die Peripherie der Muskelfaser zurück und sind daher dort nicht notwendigerweise ein Marker für eine Regeneration (Karpati *et al.*,1988; Turk *et al.*,2005). Muskelfaserzellkerne von erst kürzlich regenerierten Muskelfasern in *mdx*-Mäusen bleiben in der zentralen Position für etwa 50-100 Tage. Anschließend wandern 3–4% der Zellkerne zur peripheren subsarkolemmalen Position (Louboutin *et al.*,1993). *mdx*-Muskelfasern mit zentralem Zellkern stellen einen verlässlichen Indikator für zuvor stattgefundene, nekrotische bzw. regenerative Veränderungen des Gewebes dar und können für die Wirksamkeit eines Therapieansatzes als Marker dienen. Bezüglich des Anteils an Fasern mit zentral lokalisiertem Zellkern konnte in der Inzuchtlinie in allen drei untersuchten Muskeln, Diaphragma, *M. tibialis anterior* und *M. soleus*, eine Verringerung im Vergleich der Kontrollmäuse mit den homozygoten Knockoutmäusen gezeigt werden. Im DIA und im TA ist diese Verringerung statistisch signifikant und beträgt 40-50% bzw. 30%. Im Sol sind es immerhin noch 20-30% weniger Fasern mit zentralem Zellkern (siehe Abb. 26). Stupka und Kollegen überexprimierten das Calcineurin A $\alpha$ -Transgen (CnA $\alpha$ ) im Skelettmuskel von *mdx*-Mäusen (*mdx* CnA $\alpha$ \*). Dies hatte eine Aktivierung des Calcineurin Signalwegs zur Folge. Die Arbeitsgruppe beobachtete eine Abmilderung der Muskelpathologie der *mdx*-Mäuse, vor allem der hinteren Extremitätenmuskeln. Dabei wurde neben einer verminderten Anfälligkeit der Muskeln für eine Schädigung durch Kontraktion und eine erhöhte Resistenz gegenüber einer Ermüdung des Muskels auch eine Abnahme des Anteils an Fasern mit zentral lokalisierten Zellkernen in den *mdx* CnA $\alpha$ \*- gegenüber den *mdx*-Mäusen nachgewiesen. Die Übereinstimmung der Ergebnisse dieser Studie mit unseren eigenen Beobachtungen sprechen sehr dafür, dass auch in unserem Mausmodell der Calcineurin Signalweg aktiviert wurde und einen langsamen, oxidativen Muskelfaserphänotyp verursacht (Stupka *et al.*,2008).

Oxidative Fasern (Typ I und II A) und glykolytische Fasern (Typ IIb) unterscheiden sich auch in ihrer Querschnittsfläche (Hamalainen *et al.*, 1993). So besitzen oxidative Fasern eine geringere Fasergröße, da diese eine schnellere Diffusion von Sauerstoff aus den umgebenden Kapillaren in das Innere der Faser ermöglicht (Hughes *et al.*, 1999). In Calsarcin-2 und *ACTN3* Knockoutmäusen wurde eine verringerte Größe der glykolytischen Typ IIb Fasern nachgewiesen, wobei jedoch keine Änderung der Fasertypanteile beobachtet wurden (MacArthur *et al.*, 2007; Frey *et al.*, 2008). Die Abnahme des Durchmessers von Typ IIb Fasern in Knockoutmäusen der Studien sind vereinbar mit einer Veränderung der Fasereigenschaften hin zu einem Phänotyp typisch für langsame Fasertypen. Neben der Studie in den Calsarcin-2 und *ACTN3* Knockoutmäusen wurde auch in Myogenin-überexprimierenden Mäusen (MMg) zusätzlich zu einem erhöhten oxidativen Stoffwechsel der Muskelfasern eine Reduktion der Fasergröße ohne Veränderung der Expression der Fasertyp-spezifischen Myosinschwereketten-Isoformen beobachtet (Hughes *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde in den Muskeln Diaphragma, *M. tibialis anterior* und *M. soleus* der Inzuchtlinie die Fasergrößenverteilung ermittelt. Im DIA ergaben sich keine Veränderungen des Feret's Durchmesser zwischen den verschiedenen Genotypen, während im TA Fasern mit dem Feret's Durchmesser 10-30  $\mu\text{m}$  um etwa 15% zunahm (Abb. 27 A und B). Auch im *M. soleus* nimmt die Anzahl kleinerer Fasern, hier im Bereich  $< 10 \mu\text{m}$ , in den (*dys<sup>-y</sup>/chip<sup>-/-</sup>*)<sub>In</sub>-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren zu. Da aber in der MHC-Färbung nachgewiesen wurde, dass nur im Sol eine geringfügige Zunahme an langsamen Fasern stattgefunden hat (Abb. 30), sind andere Mechanismen für die Verringerung der Faserdurchmesser zu diskutieren. Auch in den Calsarcin-2 und *ACTN3* Knockoutmäusen wurde keine Änderung der Fasertypanteile beobachtet (MacArthur *et al.*, 2007; Frey *et al.*, 2008). In unserer Arbeit wurde eine Faserdurchmesserabnahme hauptsächlich im TA gezeigt, während das Diaphragma keine Veränderung der Fasergrößenverteilung aufweist. Daher kann man vermuten, dass es sich bei den betroffenen Fasern um Typ IIb Fasern handelt, da das Diaphragma in *mdx*-Mäusen kaum Fasern des Typs IIb besitzt (Guido *et al.*, 2010) und dagegen der TA von Wildtyp-Mäusen einen Anteil von etwa 50-90% an Typ IIb Fasern hat (Hughes *et al.*, 1999).

Gleichzeitig zur beobachteten Zunahme an kleineren Fasern konnten wir keine Veränderung der Fasergrößenvarianz zeigen (Abb. 28). Dystrophe Muskeln weisen im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen typischerweise eine erhöhte Variabilität des Faserdurchmessers auf. Der Varianzkoeffizient (VC) aller Muskelfaserdurchmesser eines Muskelschnittes stellt einen numerischen Wert für die Muskelfasergrößenvariabilität dar (Briguet *et al.*, 2004).

In einer Studie von Stupka und Kollegen wurde berichtet (Stupka *et al.*, 2008), dass *mdx*-Mäuse, die das Transgen CnA $\alpha$ \* exprimierten, wodurch eine Aktivierung des Calcineurin-Signalweges vorlag, eine Verringerung der mittleren Faserquerschnittsfläche aufwiesen. Zugleich wurde aber kein signifikanter Effekt auf die Fasergrößenvarianz dokumentiert. Diese Beobachtungen sind wiederum sehr ähnlich zu den Beobachtungen in unserer Studie und bekräftigen erneut die Annahme, dass auch hier in Folge der CHIP-Reduktion möglicherweise eine Aktivierung des Calcineurin-Signalweges stattgefunden hat.

Degeneration und Regeneration findet bei der DMD solange statt, bis das Regenerationspotential des Muskels erschöpft ist. Dann wird das Muskelgewebe durch fibrotisches Gewebe, Fettgewebe und Bindegewebe ersetzt (Torres *et al.*, 1987; Jejurikar *et al.*, 2003). Hier wurde der Anteil der Fasern mit zentral lokalisierten Zellkernen, die Muskelfasergröße, der Varianzkoeffizient und der Anteil an fibrotischem Gewebe bestimmt. Dadurch sollte überprüft werden, ob der partielle und vollständige *chip*-Knockout im *mdx*-Hintergrund eine Veränderung histologischer Merkmale dystropher Muskeln bewirkt.

Wir konnten eine deutliche Abnahme des Faseranteils mit zentral lokalisierten Zellkernen, vor allem im Diaphragma und TA, nachweisen (Abb. 26). Weiterhin sollte mittels einer Van Gieson-Färbung der tatsächliche Anteil an fibrotischem Gewebe sichtbar gemacht werden. Dabei zeigte die Van Gieson-Färbung nur im *M. tibialis anterior* der Inzuchtlinie einen erhöhten Anteil an fibrotischem Muskelgewebe in den Mäusen mit vollständigem *chip*-Knockout. (Abb. 29), obwohl auch hier eine signifikante Abnahme des Faseranteils mit zentral lokalisierten Zellkernen zu beobachten war (Abb. 26). Ansonsten ist der Anteil an fibrotischem Gewebe in den verschiedenen Genotypen der anderen beiden untersuchten Muskeln unverändert. Es ergab sich somit für die beiden Parameter Anteil an fibrotischem Gewebe und Faseranteil mit zentral lokalisierten Zellkerne kein übereinstimmendes Bild. Aufgrund einer sehr hohen Standardabweichung bei der Auswertung des Anteils an fibrotischem Gewebe, werden diese Ergebnisse als weniger zuverlässig und aussagekräftig eingestuft. Eventuell ist die Van Gieson-Färbung auch nicht sensitiv genug, da Bereiche mit infiltrierenden mononuklearen und inflammatorischen Zellen im degenerierenden Gewebe nicht angefärbt werden. Die Bestimmung des Anteils an Fasern mit zentral lokalisierten Zellkernen stellt womöglich in dieser Arbeit die verlässlichere Methode dar, um den Degenerations- und Regenerationsgrad zu beurteilen. Demnach konnte der *chip*-Knockout die Degenerationsprozesse im *mdx*-Hintergrund reduzieren.

### 5.2.3 Fazit und Ausblick

Die Entwicklung des Mausmodells einer *dys<sup>-/-</sup>/chip<sup>-/-</sup>*- bzw. *dys<sup>-y</sup>/chip<sup>-/-</sup>*-Knockoutmaus war teilweise erfolgreich, da nur wenige homozygote Knockoutmäuse überlebt haben, die für die Experimente zur Verfügung standen. Dennoch waren die wenigen überlebenden Mäuse ausreichend, um sich ein Bild vom Einfluss des *chip*-Knockouts auf den *mdx*-Phänotyp zu verschaffen. Zusammenfassend zeigen die Muskelfasern der *chip*-Knockoutmäuse übereinstimmende Veränderungen verschiedener Parameter wie der kontraktile Eigenschaften und Resistenz gegenüber Ermüdung des Muskels, des Stoffwechsel der Fasern, der Fasergröße und des Degenerations- und Regenerationsgrades in Richtung einer Verschiebung hin zu Eigenschaften langsamer Muskelfasern, ohne dass es dabei zu einer veränderten MHC-Expression kommt. Zusätzlich ähnelt der Phänotyp in einem hohen Ausmaß dem Phänotyp verschiedener anderer transgener Mausmodelle, welche einen verstärkt oxidativen Stoffwechsel und/oder eine verbesserte Muskelausdauer aufwiesen. Dabei handelt es sich um *ACTN3*- bzw. Calcineurin  $\alpha$ - (*mdx Cn $\alpha$ \**) bzw. Myogenin-überexprimierende Mäuse (MMg) und um *mdx*-Mäuse, in denen die Aktivität des IGF-1/PI3K/Akt Signalweges erhöht war. In den vier erstgenannten transgenen Mausmodellen wurde eine Aktivierung des Calcineurin-Signalweges als ursächlich für den beobachteten Phänotyp diskutiert (Hughes *et al.*,1999; MacArthur *et al.*,2007; Frey *et al.*,2008; Stupka *et al.*,2008). Diese Tatsache lässt vermuten, dass CHIP als E3/E4-Ligase und Cochaperon einen Regulator dieses Signalweges entweder direkt oder indirekt beeinflusst. Als Kandidaten bietet sich UNC-45b und  $\alpha$ -Aktinin-2 an. UNC-45b stellt ein direktes Ziel für die Ubiquitinierung durch CHIP und den anschließenden proteasomalen Abbau dar (Hoppe *et al.*,2004). So lässt sich spekulieren, dass CHIP über UNC-45b den  $\alpha$ -Aktinin-2 Gehalt an der Z-Scheibe bestimmen kann. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass CHIP direkt auf den  $\alpha$ -Aktinin-2-Spiegel Einfluss nimmt. Wir hatten diskutiert, dass  $\alpha$ -Aktinin-2 über eine Vielzahl von Interaktionen mit dem Calcineurin-Signalweg in Verbindung steht und dessen Aktivität beeinflussen kann. Ein möglicher Einfluss auf die kontraktile Eigenschaften und den  $\alpha$ -Aktinin-2-Spiegel in unserem Mausmodell kann auch dem IGF-1/PI3K/Akt Signalweg zugeschrieben werden. *Mdx*-Mäuse, in denen eine erhöhte Akt-Aktivität induziert wurde, wiesen einen Kraftabfall im Anschluss an eine exzentrische Kontraktion auf, der annähernd dem Wildtypniveau entsprach. Zudem waren Gene hochreguliert, welche für Proteine in der Z-Scheibe kodierten (Blaauw *et al.*,2008). Man könnte vermuten, dass auch  $\alpha$ -Aktinin-2 aufgrund der Akt-Aktivierung stärker exprimiert wurde. Akt stellt ein direktes Ziel von CHIP dar

(Dickey *et al.*,2008), weshalb wir auch in dieser Arbeit einen Zusammenhang mit einer Aktivierung des IGF-1/PI3K/Akt Signalweges sehen. CHIP, ein Cochaperon von Hsp70, und Akt sind auch an der Regulation der Wirkung von FOXO3a bzw. FOXO3 auf den Atrogin-1 Promotor beteiligt (Sandri *et al.*,2004; Senf *et al.*,2010). FOXO3a bzw. FOXO3 wird durch Hsp70 (Senf *et al.*,2010) bzw. durch Akt inhibiert (Sandri *et al.*,2004). Eine erniedrigte Expression von Atrogin-1 führt dazu, dass Myogenin nicht abgebaut wird. Erhöhte Myogeninmengen wurden ebenfalls mit einem verstärkt oxidativen Stoffwechsel in Verbindung gebracht (Hughes *et al.*,1999). Darüberhinaus konnte in *C.elegans* gezeigt werden, dass das CHIP-Substrat SGK-1 ein FOXO3a Homolog inaktiviert (Hertweck *et al.*,2004; Lamitina *et al.*,2005). Zusammengenommen scheint eine Verschiebung hin zu einem stärker oxidativen Stoffwechsel in unserem Mausmodell wahrscheinlich, ob nun aufgrund einer Aktivierung des Calcineurin- oder des IGF-1/PI3K/Akt Signalweges oder anderer Mechanismen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Es wurde eindeutig gezeigt, dass das Eingreifen in die Expression von Proteinen wie CHIP, welche an einer Vielzahl von Prozessen im Körper beteiligt sind, einen erfolgreichen Einsatz als Therapie einschränkt oder verhindert. Die Reduktion von CHIP ist nicht geeignet, um die dystrophe Pathophysiologie kausal zu therapieren.

Interessanterweise konnten die beschriebenen Effekte auf funktioneller Ebene auch in den heterozygoten Knockoutmäusen gezeigt werden, wenn auch etwas schwächer ausgeprägt. Auch die Expressionsmuster der verschiedenen Marker  $\alpha$ -Aktinin-2, Calsarcin-2 und Myogenin waren in den heterozygoten Knockoutmäusen nahezu identisch zu den Expressionsmustern in den homozygoten Knockoutmäusen. Histologische und morphologische Eigenschaften der Muskelfasern waren in den heterozygoten Knockoutmäusen allerdings eher vergleichbar mit den Kontrollmäusen. Eine Ausnahme stellte hier die Fasergrößenverteilung dar, welche in den heterozygoten Knockoutmäusen wieder eher der Verteilung in den homozygoten Knockoutmäusen entspricht. Jedoch ist an dieser Stelle auch zu betonen, dass die funktionellen Effekte bedeutender sind, da sie eine tatsächliche Verbesserung der Muskelfunktion dokumentieren. Ein Vorteil der heterozygoten Knockoutmäuse besteht darin, dass sie eine normale Lebenserwartung und Fitness aufwiesen. Ziel dieser Arbeit war es schließlich, einen Therapieansatz für eine spätere Translation in den Patienten auf seine Tauglichkeit zu untersuchen. Es wäre ohnehin nicht wünschenswert eine Therapie zu entwickeln, welche den vollständigen Knockout eines so essentiellen Proteins wie CHIP zur Folge hat. Ein möglicher muskelspezifischer adenoviraler Knockdown von *chip* im Menschen würde eher der Situation in den heterozygoten Knockoutmäusen entsprechen. Deshalb können die heterozygoten

Knockoutmäuse durchaus das geeignetere Mausmodell für weitere Untersuchungen dieses Therapiensatzes einer CHIP-Reduktion im dystrophen Muskel darstellen.

**Literaturverzeichnis**

- Abbott, K. L., B. B. Friday, *et al.* (1998). "Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells." Mol Biol Cell **9**(10): 2905-2916.
- Acharyya, S., M. E. Butchbach, *et al.* (2005). "Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia." Cancer Cell **8**(5): 421-432.
- Alfieri, C. M., H. J. Evans-Anderson, *et al.* (2007). "Developmental regulation of the mouse IGF-I exon 1 promoter region by calcineurin activation of NFAT in skeletal muscle." Am J Physiol Cell Physiol **292**(5): C1887-1894.
- Allamand, V. and K. P. Campbell (2000). "Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies." Hum Mol Genet **9**(16): 2459-2467.
- Allen, D. G., B. T. Zhang, *et al.* (2010). "Stretch-Induced Membrane Damage in Muscle: Comparison of Wild-Type and mdx Mice." Muscle Biophysics: From Molecules to Cells **682**: 297-313.
- Alter, J., F. Lou, *et al.* (2006). "Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology." Nat Med **12**(2): 175-177.
- Ambrosio, C. E., L. Fadel, *et al.* (2009). "Identification of three distinguishable phenotypes in golden retriever muscular dystrophy." Genet Mol Res **8**(2): 389-396.
- Ambrosio, C. E., M. C. Valadares, *et al.* (2008). "Ringo, a Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog with absent dystrophin but normal strength." Neuromuscul Disord **18**(11): 892-893.
- Anderson, J. E., M. Weber, *et al.* (2000). "Deflazacort increases laminin expression and myogenic repair, and induces early persistent functional gain in mdx mouse muscular dystrophy." Cell Transplant **9**(4): 551-564.
- Anderson, J. L., S. I. Head, *et al.* (2002). "Brain function in Duchenne muscular dystrophy." Brain **125**(Pt 1): 4-13.
- Angelini, C., E. Pegoraro, *et al.* (1994). "Deflazacort in Duchenne dystrophy: study of long-term effect." Muscle Nerve **17**(4): 386-391.
- Angus, L. M., J. V. Chakkalakal, *et al.* (2005). "Calcineurin-NFAT signaling, together with GABP and peroxisome PGC-1{alpha}, drives utrophin gene expression at the neuromuscular junction." Am J Physiol Cell Physiol **289**(4): C908-917.
- Arechavala-Gomez, V., I. R. Graham, *et al.* (2007). "Comparative analysis of antisense oligonucleotide sequences for targeted skipping of exon 51 during dystrophin pre-mRNA splicing in human muscle." Hum Gene Ther **18**(9): 798-810.
- Asakura, A. and M. A. Rudnicki (2002). "Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation." Exp Hematol **30**(11): 1339-1345.
- Ballinger, C. A., P. Connell, *et al.* (1999). "Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions." Mol Cell Biol **19**(6): 4535-4545.
- Banks, G. B., P. Gregorevic, *et al.* (2007). "Functional capacity of dystrophins carrying deletions in the N-terminal actin-binding domain." Hum Mol Genet **16**(17): 2105-2113.
- Barton-Davis, E. R., L. Cordier, *et al.* (1999). "Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice." J Clin Invest **104**(4): 375-381.
- Baumeister, R. and L. Ge (2002). "The worm in us - Caenorhabditis elegans as a model of human disease." Trends Biotechnol **20**(4): 147-148.
- Becker, P. E., Kiener, F. (1955). "Eine neue X-chromosomale Muskeldystropie." Arch Psychiatr Zeitschr Neurol **193**: 427-428.

- Beggs, A. H., T. J. Byers, *et al.* (1992). "Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11." J Biol Chem **267**(13): 9281-9288.
- Belova, L., S. Sharma, *et al.* (2006). "Ubiquitin-proteasome degradation of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 (SGK-1) is mediated by the chaperone-dependent E3 ligase CHIP." Biochem J **400**(2): 235-244.
- Benchaouir, R., M. Meregalli, *et al.* (2007). "Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice." Cell Stem Cell **1**(6): 646-657.
- Bensaad, K., A. Tsuruta, *et al.* (2006). "TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis." Cell **126**(1): 107-120.
- Bernick, E. P., P. J. Zhang, *et al.* (2010). "Knockdown and overexpression of Unc-45b result in defective myofibril organization in skeletal muscles of zebrafish embryos." BMC Cell Biol **11**: 70.
- Beroud, C., S. Tuffery-Giraud, *et al.* (2007). "Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy." Hum Mutat **28**(2): 196-202.
- Bessou, C., J. B. Giuglia, *et al.* (1998). "Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission." Neurogenetics **2**(1): 61-72.
- Bianchi, M. L., A. Mazzanti, *et al.* (2003). "Bone mineral density and bone metabolism in Duchenne muscular dystrophy." Osteoporos Int **14**(9): 761-767.
- Bidou, L., I. Hatin, *et al.* (2004). "Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment." Gene Ther **11**(7): 619-627.
- Biggar, W. D., M. Gingras, *et al.* (2001). "Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy." J Pediatr **138**(1): 45-50.
- Blaauw, B., C. Mammucari, *et al.* (2008). "Akt activation prevents the force drop induced by eccentric contractions in dystrophin-deficient skeletal muscle." Hum Mol Genet **17**(23): 3686-3696.
- Blake, D. J. and S. Kroger (2000). "The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle?" Trends Neurosci **23**(3): 92-99.
- Blake, D. J., J. M. Tinsley, *et al.* (1996). "Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin." Brain Pathol **6**(1): 37-47.
- Blake, D. J., A. Weir, *et al.* (2002). "Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle." Physiol Rev **82**(2): 291-329.
- Blottner, D. and G. Luck (2001). "Just in time and place: NOS/NO system assembly in neuromuscular junction formation." Microsc Res Tech **55**(3): 171-180.
- Bonifati, D. M., S. F. Witchel, *et al.* (2006). "The glucocorticoid receptor N363S polymorphism and steroid response in Duchenne dystrophy." J Neurol Neurosurg Psychiatry **77**(10): 1177-1179.
- Bonifati, M. D., G. Ruzza, *et al.* (2000). "A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy." Muscle Nerve **23**(9): 1344-1347.
- Bonuccelli, G., F. Sotgia, *et al.* (2003). "Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins." Am J Pathol **163**(4): 1663-1675.
- Bork, P. and M. Sudol (1994). "The WW domain: a signalling site in dystrophin?" Trends Biochem Sci **19**(12): 531-533.

- Brennan, J. E., D. S. Chao, *et al.* (1995). "Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy." Cell **82**(5): 743-752.
- Bresolin, N., E. Castelli, *et al.* (1994). "Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy." Neuromuscul Disord **4**(4): 359-369.
- Briguet, A., I. Courdier-Fruh, *et al.* (2004). "Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse." Neuromuscul Disord **14**(10): 675-682.
- Brooke, M. H., G. M. Fenichel, *et al.* (1987). "Clinical investigation of Duchenne muscular dystrophy. Interesting results in a trial of prednisone." Arch Neurol **44**(8): 812-817.
- Brooks, S. V. (1998). "Rapid recovery following contraction-induced injury to in situ skeletal muscles in mdx mice." J Muscle Res Cell Motil **19**(2): 179-187.
- Bruns, W., R. Dermietzel, *et al.* (1986). "Carbonic anhydrase in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle." J Physiol **371**: 351-364.
- Buckle, V. J., J. L. Guenet, *et al.* (1990). "Localisation of a dystrophin-related autosomal gene to 6q24 in man, and to mouse chromosome 10 in the region of the dystrophin muscularis (dy) locus." Hum Genet **85**(3): 324-326.
- Bulfield, G., W. G. Siller, *et al.* (1984). "X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(4): 1189-1192.
- Burrow, K. L., D. D. Covert, *et al.* (1991). "Dystrophin expression and somatic reversion in prednisone-treated and untreated Duchenne dystrophy. CIDD Study Group." Neurology **41**(5): 661-666.
- Campanelli, J. T., S. L. Roberds, *et al.* (1994). "A role for dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR clustering." Cell **77**(5): 663-674.
- Cao, P. R., H. J. Kim, *et al.* (2005). "Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting." Int J Biochem Cell Biol **37**(10): 2088-2097.
- Carlson, C. G. and R. V. Makiejus (1990). "A noninvasive procedure to detect muscle weakness in the mdx mouse." Muscle Nerve **13**(6): 480-484.
- Carnwath, J. W. and D. M. Shotton (1987). "Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles." J Neurol Sci **80**(1): 39-54.
- Cartaud, A., S. Coutant, *et al.* (1998). "Evidence for in situ and in vitro association between beta-dystroglycan and the subsynaptic 43K rapsyn protein. Consequence for acetylcholine receptor clustering at the synapse." J Biol Chem **273**(18): 11321-11326.
- Chamberlain, J. S. and G. M. Benian (2000). "Muscular dystrophy: the worm turns to genetic disease." Curr Biol **10**(21): R795-797.
- Chambers, S. P., A. Dodd, *et al.* (2001). "Dystrophin in adult zebrafish muscle." Biochem Biophys Res Commun **286**(3): 478-483.
- Chan, S., J. T. Seto, *et al.* (2008). "A gene for speed: contractile properties of isolated whole EDL muscle from an alpha-actinin-3 knockout mouse." Am J Physiol Cell Physiol **295**(4): C897-904.
- Charge, S. and M. A. Rudnicki (2003). "Fusion with the fused: a new role for interleukin-4 in the building of muscle." Cell **113**(4): 422-423.
- Charge, S. B. and M. A. Rudnicki (2004). "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration." Physiol Rev **84**(1): 209-238.
- Chaubourt, E., P. Fossier, *et al.* (1999). "Nitric oxide and l-arginine cause an accumulation of utrophin at the sarcolemma: a possible compensation for dystrophin loss in Duchenne muscular dystrophy." Neurobiol Dis **6**(6): 499-507.
- Chaubourt, E., V. Voisin, *et al.* (2002). "Muscular nitric oxide synthase (muNOS) and utrophin." J Physiol Paris **96**(1-2): 43-52.

- Chen, D., Z. Yu, *et al.* (2006). "The p53 pathway promotes efficient mitochondrial DNA base excision repair in colorectal cancer cells." Cancer Res **66**(7): 3485-3494.
- Chirmule, N., K. Probert, *et al.* (1999). "Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans." Gene Ther **6**(9): 1574-1583.
- Chung, W. and J. T. Campanelli (1999). "WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding." Mol Cell Biol Res Commun **2**(3): 162-171.
- Clarke, M. S., R. Khakee, *et al.* (1993). "Loss of cytoplasmic basic fibroblast growth factor from physiologically wounded myofibers of normal and dystrophic muscle." J Cell Sci **106** (Pt 1): 121-133.
- Clerk, A., G. E. Morris, *et al.* (1993). "Dystrophin-related protein, utrophin, in normal and dystrophic human fetal skeletal muscle." Histochem J **25**(8): 554-561.
- Cohn, R. D. (2005). "Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond." Neuromuscul Disord **15**(3): 207-217.
- Cognato, H. and P. D. Yurchenco (2000). "Form and function: the laminin family of heterotrimers." Dev Dyn **218**(2): 213-234.
- Connell, P., C. A. Ballinger, *et al.* (2001). "The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins." Nat Cell Biol **3**(1): 93-96.
- Conway, S. J., D. J. Henderson, *et al.* (1997). "Pax3 is required for cardiac neural crest migration in the mouse: evidence from the splotch (Sp2H) mutant." Development **124**(2): 505-514.
- Cooper, B. J., N. J. Winand, *et al.* (1988). "The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs." Nature **334**(6178): 154-156.
- Corbi, N., V. Libri, *et al.* (2000). "The artificial zinc finger coding gene 'Jazz' binds the utrophin promoter and activates transcription." Gene Ther **7**(12): 1076-1083.
- Cossu, G. and P. Bianco (2003). "Mesoangioblasts--vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues." Curr Opin Genet Dev **13**(5): 537-542.
- Cote, P. D., H. Moukhles, *et al.* (1999). "Chimaeric mice deficient in dystroglycans develop muscular dystrophy and have disrupted myoneural synapses." Nat Genet **23**(3): 338-342.
- Coulton, G. R., J. E. Morgan, *et al.* (1988). "The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation." Neuropathol Appl Neurobiol **14**(1): 53-70.
- Cox, G. A., N. M. Cole, *et al.* (1993). "Overexpression of dystrophin in transgenic mdx mice eliminates dystrophic symptoms without toxicity." Nature **364**(6439): 725-729.
- Cox, G. A., Y. Sunada, *et al.* (1994). "Dp71 can restore the dystrophin-associated glycoprotein complex in muscle but fails to prevent dystrophy." Nat Genet **8**(4): 333-339.
- Crawford, G. E., J. A. Faulkner, *et al.* (2000). "Assembly of the dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin COOH-terminal domain." J Cell Biol **150**(6): 1399-1410.
- Crocetti, L., A. Maresca, *et al.* (2009). "A thiabendazole sulfonamide shows potent inhibitory activity against mammalian and nematode alpha-carbonic anhydrases." Bioorg Med Chem Lett **19**(5): 1371-1375.
- Cullen, M. J. and E. Jaros (1988). "Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy." Acta Neuropathol **77**(1): 69-81.
- Dai, Q., C. Zhang, *et al.* (2003). "CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress." EMBO J **22**(20): 5446-5458.
- Dalkilic, I. and L. M. Kunkel (2003). "Muscular dystrophies: genes to pathogenesis." Curr Opin Genet Dev **13**(3): 231-238.
- Danielou, G., A. S. Comtois, *et al.* (2001). "Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure and injury." FASEB J **15**(9): 1655-1657.

- Danowski, B. A., K. Imanaka-Yoshida, *et al.* (1992). "Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes." J Cell Biol **118**(6): 1411-1420.
- Daoud, F., A. Candelario-Martinez, *et al.* (2009). "Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions." PLoS One **4**(8): e6574.
- De Luca, A., B. Nico, *et al.* (2005). "A multidisciplinary evaluation of the effectiveness of cyclosporine A in dystrophic Mdx mice." American Journal of Pathology **166**(2): 477-489.
- Decker, B., S. Sender, *et al.* (1996). "Membrane-associated carbonic anhydrase IV in skeletal muscle: subcellular localization." Histochem Cell Biol **106**(4): 405-411.
- Deconinck, A. E., J. A. Rafael, *et al.* (1997a). "Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy." Cell **90**(4): 717-727.
- Deconinck, N., T. Ragot, *et al.* (1996). "Functional protection of dystrophic mouse (mdx) muscles after adenovirus-mediated transfer of a dystrophin minigene." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(8): 3570-3574.
- Deconinck, N., J. Tinsley, *et al.* (1997b). "Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice." Nat Med **3**(11): 1216-1221.
- Dellavalle, A., M. Sampaolesi, *et al.* (2007). "Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells." Nat Cell Biol **9**(3): 255-267.
- Demand, J., S. Alberti, *et al.* (2001). "Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling." Curr Biol **11**(20): 1569-1577.
- Denti, M. A., A. Rosa, *et al.* (2006). "Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice." Hum Gene Ther **17**(5): 565-574.
- Dickey, C. A., J. Koren, *et al.* (2008). "Akt and CHIP coregulate tau degradation through coordinated interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3622-3627.
- Doherty, M. J., B. A. Ashton, *et al.* (1998). "Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo." J Bone Miner Res **13**(5): 828-838.
- Drachman, D. B., K. V. Toyka, *et al.* (1974). "Prednisone in Duchenne muscular dystrophy." Lancet **2**(7894): 1409-1412.
- Dubowitz, V. (1978). Muscle disorders in childhood. Major Probl Clin Pediatr. **16**: iii-xiii, 1-282.
- Duchenne, G. B. A. (1868). "Recherches sur la paralysie musculaire pseudo hypertrophique ou paralysie myo-sclerosique." Arch Gen Med **11**: 500-588.
- Duclos, F., V. Straub, *et al.* (1998). "Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice." J Cell Biol **142**(6): 1461-1471.
- Dunant, P. (2003). Strategies for Molecular Therapy of Duchenne Muscular Dystrophy. Fakultät für Chemie und Pharmazie. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Ehmer, S., R. Herrmann, *et al.* (1997). "Spatial distribution of beta-spectrin in normal and dystrophic human skeletal muscle." Acta Neuropathol **94**(3): 240-246.
- Emery, A. E. H. (1993). "Duchenne Muscular Dystrophy." Oxford University Press **24 und 187**.
- England, S. B., L. V. Nicholson, *et al.* (1990). "Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin." Nature **343**(6254): 180-182.
- Ervasti, J. M. (2003). "Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle." J Biol Chem **278**(16): 13591-13594.
- Ervasti, J. M. and K. P. Campbell (1993). "A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin." J Cell Biol **122**(4): 809-823.
- Esser, C., M. Scheffner, *et al.* (2005). "The chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP is able to target p53 for proteasomal degradation." J Biol Chem **280**(29): 27443-27448.

- Farini, A., P. Razini, *et al.* (2009). "Cell Based Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy." Journal of Cellular Physiology **221**(3): 526-534.
- Fenichel, G. M., J. M. Florence, *et al.* (1991a). "Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy." Neurology **41**(12): 1874-1877.
- Fenichel, G. M., J. R. Mendell, *et al.* (1991b). "A comparison of daily and alternate-day prednisone therapy in the treatment of Duchenne muscular dystrophy." Arch Neurol **48**(6): 575-579.
- Ferrer, A., H. Foster, *et al.* (2004). "Long-term expression of full-length human dystrophin in transgenic mdx mice expressing internally deleted human dystrophins." Gene Ther **11**(11): 884-893.
- Finn, D. M. and K. Ohlendieck (1998a). "Cross-linking analysis of rabbit skeletal muscle dystrophin." Biochem Soc Trans **26**(3): S291.
- Finn, D. M. and K. Ohlendieck (1998b). "Oligomerization of beta-dystroglycan in rabbit diaphragm and brain as revealed by chemical crosslinking." Biochim Biophys Acta **1370**(2): 325-336.
- Fisher, I., D. Abraham, *et al.* (2005). "Prednisolone-induced changes in dystrophic skeletal muscle." FASEB J **19**(7): 834-836.
- Fisher, R., J. M. Tinsley, *et al.* (2001). "Non-toxic ubiquitous over-expression of utrophin in the mdx mouse." Neuromuscul Disord **11**(8): 713-721.
- Fletcher, S., K. Honeyman, *et al.* (2007). "Morpholino oligomer-mediated exon skipping averts the onset of dystrophic pathology in the mdx mouse." Mol Ther **15**(9): 1587-1592.
- Fletcher, S., K. Honeyman, *et al.* (2006). "Dystrophin expression in the mdx mouse after localised and systemic administration of a morpholino antisense oligonucleotide." J Gene Med **8**(2): 207-216.
- Frey, N., T. Barrientos, *et al.* (2004). "Mice lacking calcyri-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress." Nat Med **10**(12): 1336-1343.
- Frey, N., D. Frank, *et al.* (2008). "Calcyri-2 deficiency increases exercise capacity in mice through calcineurin/NFAT activation." J Clin Invest **118**(11): 3598-3608.
- Frey, N., J. A. Richardson, *et al.* (2000). "Calcyris, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14632-14637.
- Friday, B. B., P. O. Mitchell, *et al.* (2003). "Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD." Differentiation **71**(3): 217-227.
- Gaud, A., J. M. Simon, *et al.* (2004). Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. Neuromuscul Disord. **14**: 365-370.
- Gavina, M., M. Belicchi, *et al.* (2006). "VCAM-1 expression on dystrophic muscle vessels has a critical role in the recruitment of human blood-derived CD133+ stem cells after intra-arterial transplantation." Blood **108**(8): 2857-2866.
- Gehmlich, K., C. Geier, *et al.* (2004). "Decreased interactions of mutant muscle LIM protein (MLP) with N-RAP and alpha-actinin and their implication for hypertrophic cardiomyopathy." Cell Tissue Res **317**(2): 129-136.
- Ghosh, A., Y. Yue, *et al.* (2007). "Efficient whole-body transduction with trans-splicing adeno-associated viral vectors." Mol Ther **15**(4): 750-755.
- Giacomotto, J., C. Pertl, *et al.* (2009). "Evaluation of the therapeutic potential of carbonic anhydrase inhibitors in two animal models of dystrophin deficient muscular dystrophy." Hum Mol Genet **18**(21): 4089-4101.
- Gieseler, K., M. Abdel-Dayem, *et al.* (1999a). "In vitro interactions of *Caenorhabditis elegans* dystrophin with dystrobrevin and syntrophin." FEBS Lett **461**(1-2): 59-62.
- Gieseler, K., C. Bessou, *et al.* (1999b). "Dystrobrevin- and dystrophin-like mutants display similar phenotypes in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Neurogenetics **2**(2): 87-90.

- Gilbert, R., J. Nalbantoglu, *et al.* (1999). "Adenovirus-mediated utrophin gene transfer mitigates the dystrophic phenotype of mdx mouse muscles." Hum Gene Ther **10**(8): 1299-1310.
- Gillis, J. M. (1999). "Understanding dystrophinopathies: an inventory of the structural and functional consequences of the absence of dystrophin in muscles of the mdx mouse." J Muscle Res Cell Motil **20**(7): 605-625.
- Gillis, J. M. and N. Deconinck (1998). "The physiological evaluation of gene therapies of dystrophin-deficient muscles." Mechanisms of Work Production and Work Absorption in Muscle **453**: 411-417.
- Gorospe, J. R. and E. P. Hoffman (1992). "Duchenne muscular dystrophy." Curr Opin Rheumatol **4**(6): 794-800.
- Gowers, W. R. (1879). "Clinical lecture on pseudohypertrophic muscular paralysis." Lancet **73**-75.
- Goyenvalle, A., A. Vulin, *et al.* (2004). "Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping." Science **306**(5702): 1796-1799.
- Grady, R. M., H. Teng, *et al.* (1997). "Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy." Cell **90**(4): 729-738.
- Gregorevic, P., J. M. Allen, *et al.* (2006). "rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice." Nat Med **12**(7): 787-789.
- Griggs, R. C., R. T. Moxley, 3rd, *et al.* (1991). "Prednisone in Duchenne dystrophy. A randomized, controlled trial defining the time course and dose response. Clinical Investigation of Duchenne Dystrophy Group." Arch Neurol **48**(4): 383-388.
- Guido, A. N., G. E. Campos, *et al.* (2010). "Fiber type composition of the sternomastoid and diaphragm muscles of dystrophin-deficient mdx mice." Anat Rec (Hoboken) **293**(10): 1722-1728.
- Guyon, J. R., A. N. Mosley, *et al.* (2003). "The dystrophin associated protein complex in zebrafish." Hum Mol Genet **12**(6): 601-615.
- Hagerhall, C. (1997). "Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme." Biochim Biophys Acta **1320**(2): 107-141.
- Hamalainen, N. and D. Pette (1993). "The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit." J Histochem Cytochem **41**(5): 733-743.
- Hardiman, O., R. M. Sklar, *et al.* (1993). "Methylprednisolone selectively affects dystrophin expression in human muscle cultures." Neurology **43**(2): 342-345.
- Head, S. I., D. A. Williams, *et al.* (1992). "Abnormalities in structure and function of limb skeletal muscle fibres of dystrophic mdx mice." Proc Biol Sci **248**(1322): 163-169.
- Heine, W. O. P. (1998). *Umweltmanagement in der Labortierhaltung*. Lengerich, Berlin, Düsseldorf, Leipzig, Riga, Scottsdale, Wien, Zagreb, Pabst Science Publishers.
- Henry, M. D. and K. P. Campbell (1996). "Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **8**(5): 625-631.
- Hertweck, M., C. Gobel, *et al.* (2004). "C. elegans SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span." Dev Cell **6**(4): 577-588.
- Hewett-Emmett, D. (2000). "Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families." EXS(90): 29-76.
- Hodges, B. L., Kaufman, S.J. (1996). "Developmental regulation and functional significance of alternative splicing of NCAM and  $\alpha 7\beta 1$  integrin in skeletal muscle." Basic Appl Myol **6**: 437-446.
- Hoffman, E. P. and D. Dressman (2001). "Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy." Trends Pharmacol Sci **22**(9): 465-470.
- Hoppe, T., G. Cassata, *et al.* (2004). "Regulation of the myosin-directed chaperone UNC-45 by a novel E3/E4-multiubiquitylation complex in C. elegans." Cell **118**(3): 337-349.

- Horsley, V., K. M. Jansen, *et al.* (2003). "IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth." Cell **113**(4): 483-494.
- Howell, J. M., S. Fletcher, *et al.* (1997). "Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials." Neuromuscul Disord **7**(5): 325-328.
- Huang, X., F. Poy, *et al.* (2000). "Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan." Nat Struct Biol **7**(8): 634-638.
- Hughes, S. M., M. M. Chi, *et al.* (1999). "Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice." J Cell Biol **145**(3): 633-642.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., J. M. Ervasti, *et al.* (1992). "Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix." Nature **355**(6362): 696-702.
- Ibrahim, M. M., M. Razmara, *et al.* (1998). "Altered expression of mitochondrial 16S ribosomal RNA in p53-deficient mouse embryos revealed by differential display." Biochim Biophys Acta **1403**(3): 254-264.
- Inagaki, K., S. Fuess, *et al.* (2006). "Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8." Mol Ther **14**(1): 45-53.
- Itoh-Satoh, M., T. Hayashi, *et al.* (2002). "Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy." Biochem Biophys Res Commun **291**(2): 385-393.
- Jacobs, S. C., A. L. Bootsma, *et al.* (1996). "Prednisone can protect against exercise-induced muscle damage." J Neurol **243**(5): 410-416.
- James, M., T. M. Nguyen, *et al.* (1996). "Utrophin-dystroglycan complex in membranes of adherent cultured cells." Cell Motil Cytoskeleton **33**(3): 163-174.
- James, M., C. Simmons, *et al.* (1995). "Evidence for a utrophin-glycoprotein complex in cultured cell lines and a possible role in cell adhesion." Biochem Soc Trans **23**(3): 398S.
- Jana, N. R., P. Dikshit, *et al.* (2005). "Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes." J Biol Chem **280**(12): 11635-11640.
- Jejurikar, S. S. and W. M. Kuzon, Jr. (2003). "Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle." Apoptosis **8**(6): 573-578.
- Jiang, J., C. A. Ballinger, *et al.* (2001). "CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation." J Biol Chem **276**(46): 42938-42944.
- Jogo, M., S. Shiraishi, *et al.* (2009). "Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase." FEBS Lett **583**(17): 2715-2719.
- Jung, D., B. Yang, *et al.* (1995). "Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan." J Biol Chem **270**(45): 27305-27310.
- Kamogawa, Y., S. Biro, *et al.* (2001). "Dystrophin-deficient myocardium is vulnerable to pressure overload in vivo." Cardiovasc Res **50**(3): 509-515.
- Kampinga, H. H., B. Kanon, *et al.* (2003). "Overexpression of the cochaperone CHIP enhances Hsp70-dependent folding activity in mammalian cells." Mol Cell Biol **23**(14): 4948-4958.
- Karpati, G., S. Carpenter, *et al.* (1993). "Localization and quantitation of the chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in normal and pathological human muscle." J Neuropathol Exp Neurol **52**(2): 119-128.
- Karpati, G., S. Carpenter, *et al.* (1988). "Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer necrosis in mdx mouse dystrophy." Muscle Nerve **11**(8): 795-803.
- Kennedy, S., D. Wang, *et al.* (2004). "A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*." Nature **427**(6975): 645-649.

- Khan, J., M. L. Bittner, *et al.* (1999). "cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13264-13269.
- Khurana, T. S., S. C. Watkins, *et al.* (1991). "Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle." Neuromuscul Disord **1**(3): 185-194.
- Khurana, T. S., S. C. Watkins, *et al.* (1992). "The subcellular distribution of chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in the brain." J Cell Biol **119**(2): 357-366.
- Kinali, M., V. Arechavala-Gomez, *et al.* (2009). "Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study." Lancet Neurol **8**(10): 918-928.
- Kirschner, J., J. Schessl, *et al.* (2010). "Treatment of Duchenne muscular dystrophy with ciclosporin A: a randomised, double-blind, placebo-controlled multicentre trial." Lancet Neurol **9**(11): 1053-1059.
- Koenig, M., A. H. Beggs, *et al.* (1989). "The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion." Am J Hum Genet **45**(4): 498-506.
- Koenig, M. and L. M. Kunkel (1990). "Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility." J Biol Chem **265**(8): 4560-4566.
- Koenig, M., A. P. Monaco, *et al.* (1988). "The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein." Cell **53**(2): 219-228.
- Kornegay, J. N., D. D. Cundiff, *et al.* (2003). "The cranial sartorius muscle undergoes true hypertrophy in dogs with golden retriever muscular dystrophy." Neuromuscul Disord **13**(6): 493-500.
- Lamitina, S. T. and K. Strange (2005). "Transcriptional targets of DAF-16 insulin signaling pathway protect *C. elegans* from extreme hypertonic stress." Am J Physiol Cell Physiol **288**(2): C467-474.
- Landsverk, M. L., S. Li, *et al.* (2007). "The UNC-45 chaperone mediates sarcomere assembly through myosin degradation in *Caenorhabditis elegans*." J Cell Biol **177**(2): 205-210.
- Larson, C. M. and R. C. Henderson (2000). "Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy." J Pediatr Orthop **20**(1): 71-74.
- Li, H. H., V. Kedar, *et al.* (2004). "Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex." J Clin Invest **114**(8): 1058-1071.
- Lindskog, S. (1997). "Structure and mechanism of carbonic anhydrase." Pharmacol Ther **74**(1): 1-20.
- Long, Y. C., S. Glund, *et al.* (2007). "Calcineurin regulates skeletal muscle metabolism via coordinated changes in gene expression." J Biol Chem **282**(3): 1607-1614.
- Louboutin, J. P., V. Fichter-Gagnepain, *et al.* (1993). "Morphometric analysis of mdx diaphragm muscle fibres. Comparison with hindlimb muscles." Neuromuscul Disord **3**(5-6): 463-469.
- Love, D. R., B. C. Byth, *et al.* (1993). "Dystrophin and dystrophin-related proteins: a review of protein and RNA studies." Neuromuscul Disord **3**(1): 5-21.
- Love, D. R., D. F. Hill, *et al.* (1989). "An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin." Nature **339**(6219): 55-58.
- Love, D. R., G. E. Morris, *et al.* (1991). "Tissue distribution of the dystrophin-related gene product and expression in the mdx and dy mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3243-3247.
- Lu, Q. L., C. J. Mann, *et al.* (2003). "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse." Nat Med **9**(8): 1009-1014.

- MacArthur, D. G. and K. N. North (2004). "A gene for speed? The evolution and function of alpha-actinin-3." Bioessays **26**(7): 786-795.
- MacArthur, D. G., J. T. Seto, *et al.* (2008). "An Actn3 knockout mouse provides mechanistic insights into the association between alpha-actinin-3 deficiency and human athletic performance." Hum Mol Genet **17**(8): 1076-1086.
- MacArthur, D. G., J. T. Seto, *et al.* (2007). "Loss of ACTN3 gene function alters mouse muscle metabolism and shows evidence of positive selection in humans." Nat Genet **39**(10): 1261-1265.
- Matoba, S., J. G. Kang, *et al.* (2006). "p53 regulates mitochondrial respiration." Science **312**(5780): 1650-1653.
- Matsuda, R., A. Nishikawa, *et al.* (1995). "Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle." J Biochem **118**(5): 959-964.
- Matsumura, K., J. M. Ervasti, *et al.* (1992). "Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle." Nature **360**(6404): 588-591.
- Matsuo, M. (2002). "Duchenne and Becker muscular dystrophy: from gene diagnosis to molecular therapy." IUBMB Life **53**(3): 147-152.
- McCloy, G., S. Fletcher, *et al.* (2005). "Splicing intervention for Duchenne muscular dystrophy." Curr Opin Pharmacol **5**(5): 529-534.
- McDonald, D. G., M. Kinali, *et al.* (2002). "Fracture prevalence in Duchenne muscular dystrophy." Dev Med Child Neurol **44**(10): 695-698.
- McDouall, R. M., M. J. Dunn, *et al.* (1990). "Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy." J Neurol Sci **99**(2-3): 199-217.
- McIntosh, L. M., R. E. Baker, *et al.* (1998a). "Magnetic resonance imaging of regenerating and dystrophic mouse muscle." Biochem Cell Biol **76**(2-3): 532-541.
- McIntosh, L. M., K. L. Garrett, *et al.* (1998b). "Regeneration and myogenic cell proliferation correlate with taurine levels in dystrophin- and MyoD-deficient muscles." Anat Rec **252**(2): 311-324.
- McKenna, M. J., I. Medved, *et al.* (2006). "N-acetylcysteine attenuates the decline in muscle Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-pump activity and delays fatigue during prolonged exercise in humans." J Physiol **576**(Pt 1): 279-288.
- Meacham, G. C., C. Patterson, *et al.* (2001). "The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation." Nat Cell Biol **3**(1): 100-105.
- Mehler, M. F. (2000). "Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation." Brain Res Brain Res Rev **32**(1): 277-307.
- Melis, M. A., M. Cau, *et al.* (1998). "Elevation of serum creatine kinase as the only manifestation of an intragenic deletion of the dystrophin gene in three unrelated families." Eur J Paediatr Neurol **2**(5): 255-261.
- Mendell, J. R., R. T. Moxley, *et al.* (1989). "Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy." N Engl J Med **320**(24): 1592-1597.
- Menke, A. and H. Jockusch (1991). "Decreased osmotic stability of dystrophin-less muscle cells from the mdx mouse." Nature **349**(6304): 69-71.
- Mesa, L. E., A. L. Dubrovsky, *et al.* (1991). "Steroids in Duchenne muscular dystrophy--deflazacort trial." Neuromuscul Disord **1**(4): 261-266.
- Miller, R. G., K. R. Sharma, *et al.* (1997). "Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study." Muscle Nerve **20**(4): 469-478.
- Minetti, C., K. Tanji, *et al.* (1992). "Immunologic study of vinculin in Duchenne muscular dystrophy." Neurology **42**(9): 1751-1754.
- Minetti, C., K. Tanji, *et al.* (1994). "Abnormalities in the expression of beta-spectrin in Duchenne muscular dystrophy." Neurology **44**(6): 1149-1153.

- Moens, P., P. H. Baatsen, *et al.* (1993). "Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch." J Muscle Res Cell Motil **14**(4): 446-451.
- Mohapatra, B., S. Jimenez, *et al.* (2003). "Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis." Mol Genet Metab **80**(1-2): 207-215.
- Moise, N. S., B. A. Valentine, *et al.* (1991). "Duchenne's cardiomyopathy in a canine model: electrocardiographic and echocardiographic studies." J Am Coll Cardiol **17**(3): 812-820.
- Mokri, B. and A. G. Engel (1975). "Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber." Neurology **25**(12): 1111-1120.
- Morris, G. E., T. M. Nguyen, *et al.* (1999). "Disruption of the utrophin-actin interaction by monoclonal antibodies and prediction of an actin-binding surface of utrophin." Biochem J **337** ( Pt 1): 119-123.
- Muntoni, F. and D. Wells (2007). "Genetic treatments in muscular dystrophies." Curr Opin Neurol **20**(5): 590-594.
- Murata, S., T. Chiba, *et al.* (2003). "CHIP: a quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones." Int J Biochem Cell Biol **35**(5): 572-578.
- Nakamura, A., G. V. Harrod, *et al.* (2001). "Activation of calcineurin and stress activated protein kinase/p38-mitogen activated protein kinase in hearts of utrophin-dystrophin knockout mice." Neuromuscul Disord **11**(3): 251-259.
- Neuman, S., A. Kaban, *et al.* (2001). "The dystrophin / utrophin homologues in Drosophila and in sea urchin." Gene **263**(1-2): 17-29.
- Nguyen, T. M., J. M. Ellis, *et al.* (1991). "Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines." J Cell Biol **115**(6): 1695-1700.
- Nguyen, T. M., T. T. Le, *et al.* (1992). "Utrophin, the autosomal homologue of dystrophin, is widely-expressed and membrane-associated in cultured cell lines." FEBS Lett **313**(1): 19-22.
- Nicholson, L. V., M. A. Johnson, *et al.* (1993). "Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 3. Differential diagnosis and prognosis." J Med Genet **30**(9): 745-751.
- Norwood, F. L., A. J. Sutherland-Smith, *et al.* (2000). "The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy." Structure **8**(5): 481-491.
- Nowak, K. J. and K. E. Davies (2004). "Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment." EMBO Rep **5**(9): 872-876.
- Nyamsuren, O., D. Faggionato, *et al.* (2007). "A mutation in CHN-1/CHIP suppresses muscle degeneration in Caenorhabditis elegans." Dev Biol **312**(1): 193-202.
- Ohlendieck, K., J. M. Ervasti, *et al.* (1991). "Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle." Neuron **7**(3): 499-508.
- Owonikoko, T., M. Agha, *et al.* (2007). "Gemtuzumab therapy for isolated extramedullary AML relapse following allogeneic stem-cell transplant." Nat Clin Pract Oncol **4**(8): 491-495.
- Ozawa, E., S. Noguchi, *et al.* (1998). "From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy." Muscle Nerve **21**(4): 421-438.
- Papadopoulou, L. C., C. M. Sue, *et al.* (1999). "Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene." Nat Genet **23**(3): 333-337.

- Pardo, J. V., J. D. Siliciano, *et al.* (1983). "A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(4): 1008-1012.
- Parise, G., C. E. O'Reilly, *et al.* (2006). "Molecular regulation of myogenic progenitor populations." Appl Physiol Nutr Metab **31**(6): 773-781.
- Park, J. Y., P. Y. Wang, *et al.* (2009). "p53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content." Circ Res **105**(7): 705-712, 711 p following 712.
- Pasquini, F., C. Guerin, *et al.* (1995). "The effect of glucocorticoids on the accumulation of utrophin by cultured normal and dystrophic human skeletal muscle satellite cells." Neuromuscul Disord **5**(2): 105-114.
- Pasternak, C., S. Wong, *et al.* (1995). "Mechanical function of dystrophin in muscle cells." J Cell Biol **128**(3): 355-361.
- Pastorekova, S., S. Parkkila, *et al.* (2004). "Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects." J Enzyme Inhib Med Chem **19**(3): 199-229.
- Patridge, T. A. (1997). "Models of dystrophinopathy, pathological mechanisms and assessment of therapies." Dystrophin: Gene, Protein and Cell Biology: 310-311.
- Pearce, M., D. J. Blake, *et al.* (1993). "The utrophin and dystrophin genes share similarities in genomic structure." Hum Mol Genet **2**(11): 1765-1772.
- Peault, B., M. Rudnicki, *et al.* (2007). "Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy." Mol Ther **15**(5): 867-877.
- Peters, M. F., M. E. Adams, *et al.* (1997a). "Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex." J Cell Biol **138**(1): 81-93.
- Peters, M. F., K. F. O'Brien, *et al.* (1997b). "beta-dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning, and protein associations." J Biol Chem **272**(50): 31561-31569.
- Petrof, B. (1999). Abstract der American Society of Gene Therapy. Washington, DC.
- Petrof, B. J., J. B. Shrager, *et al.* (1993). "Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3710-3714.
- Petrucelli, L., D. Dickson, *et al.* (2004). "CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation." Hum Mol Genet **13**(7): 703-714.
- Piluso, G., M. Mirabella, *et al.* (2000). "Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells." J Biol Chem **275**(21): 15851-15860.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, *et al.* (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.
- Politano, L., G. Nigro, *et al.* (2003). "Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results." Acta Myol **22**(1): 15-21.
- Pons, F., A. Robert, *et al.* (1994). "Utrophin localization in normal and dystrophin-deficient heart." Circulation **90**(1): 369-374.
- Ponting, C. P., D. J. Blake, *et al.* (1996). "ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins." Trends Biochem Sci **21**(1): 11-13.
- Porter, G. A., G. M. Dmytrenko, *et al.* (1992). "Dystrophin colocalizes with beta-spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle." J Cell Biol **117**(5): 997-1005.
- Price, F. D., K. Kuroda, *et al.* (2007). "Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy." Biochim Biophys Acta **1772**(2): 272-283.
- Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." Science **276**(5309): 71-74.

- Quinlivan, R., H. Roper, *et al.* (2005). "Report of a Muscular Dystrophy Campaign funded workshop Birmingham, UK, January 16th 2004. Osteoporosis in Duchenne muscular dystrophy; its prevalence, treatment and prevention." Neuromuscul Disord **15**(1): 72-79.
- Rauch, C. and P. T. Loughna (2005). "Static stretch promotes MEF2A nuclear translocation and expression of neonatal myosin heavy chain in C2C12 myocytes in a calcineurin- and p38-dependent manner." Am J Physiol Cell Physiol **288**(3): C593-605.
- Reimann, J., A. Irintchev, *et al.* (2000). "Regenerative capacity and the number of satellite cells in soleus muscles of normal and mdx mice." Neuromuscul Disord **10**(4-5): 276-282.
- Rifai, Z., S. Welle, *et al.* (1995). "Effect of prednisone on protein metabolism in Duchenne dystrophy." Am J Physiol **268**(1 Pt 1): E67-74.
- Rivier, F., A. Robert, *et al.* (1997). "Different utrophin and dystrophin properties related to their vascular smooth muscle distributions." FEBS Lett **408**(1): 94-98.
- Riviere, C., O. Danos, *et al.* (2006). "Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice." Gene Ther **13**(17): 1300-1308.
- Roberts, R. G. (2001). "Dystrophins and dystrobrevins." Genome Biol **2**(4): REVIEWS3006.
- Roberts, R. G., R. J. Gardner, *et al.* (1994). "Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations." Hum Mutat **4**(1): 1-11.
- Rosser, M. F., E. Washburn, *et al.* (2007). "Chaperone functions of the E3 ubiquitin ligase CHIP." J Biol Chem **282**(31): 22267-22277.
- Rubinstein, A. L. (2003). "Zebrafish: from disease modeling to drug discovery." Curr Opin Drug Discov Devel **6**(2): 218-223.
- Rybakova, I. N., K. J. Amann, *et al.* (1996). "A new model for the interaction of dystrophin with F-actin." J Cell Biol **135**(3): 661-672.
- Sacco, P., D. A. Jones, *et al.* (1992). "Contractile properties and susceptibility to exercise-induced damage of normal and mdx mouse tibialis anterior muscle." Clin Sci (Lond) **82**(2): 227-236.
- Sadoulet-Puccio, H. M., M. Rajala, *et al.* (1997). "Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12413-12418.
- Sahara, N., M. Murayama, *et al.* (2005). "In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation." J Neurochem **94**(5): 1254-1263.
- Saito, Y., S. Murayama, *et al.* (1999). "Breached cerebral glia limitans-basal lamina complex in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy." Acta Neuropathol **98**(4): 330-336.
- Sakuma, K., R. Nakao, *et al.* (2005). "Cyclosporin A treatment upregulates Id1 and Smad3 expression and delays skeletal muscle regeneration." Acta Neuropathol **110**(3): 269-280.
- Sakuma, K., J. Nishikawa, *et al.* (2003). "Calcineurin is a potent regulator for skeletal muscle regeneration by association with NFATc1 and GATA-2." Acta Neuropathol **105**(3): 271-280.
- Salamino, F., B. Sparatore, *et al.* (1994). "The plasma membrane calcium pump is the preferred calpain substrate within the erythrocyte." Cell Calcium **15**(1): 28-35.
- Saleem, A., P. J. Adhietty, *et al.* (2009). "Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle." Physiol Genomics **37**(1): 58-66.
- Salva, M. Z., C. L. Himeda, *et al.* (2007). "Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle." Mol Ther **15**(2): 320-329.
- Sandri, M., C. Sandri, *et al.* (2004). "Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy." Cell **117**(3): 399-412.
- Schatzberg, S. J., N. J. Olby, *et al.* (1999). "Molecular analysis of a spontaneous dystrophin 'knockout' dog." Neuromuscul Disord **9**(5): 289-295.

- Scheibe, R. J., K. Mundhenk, *et al.* (2008). "Carbonic anhydrases IV and IX: subcellular localization and functional role in mouse skeletal muscle." Am J Physiol Cell Physiol **294**(2): C402-412.
- Schertzer, J. D., J. G. Ryall, *et al.* (2006). "Systemic administration of IGF-I enhances oxidative status and reduces contraction-induced injury in skeletal muscles of mdx dystrophic mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(3): E499-505.
- Scheuerbrandt, G. (1998). "First meeting of the Duchenne Parent Project in Europe: Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. 7-8 November 1997, Rotterdam, The Netherlands." Neuromuscul Disord **8**(3-4): 213-219.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband, *et al.* (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nature Methods **9**(7): 671-675.
- Schor, A. M., A. E. Canfield, *et al.* (1995). "Pericyte differentiation." Clin Orthop Relat Res(313): 81-91.
- Sciandra, F., M. Schneider, *et al.* (2001). "Identification of the beta-dystroglycan binding epitope within the C-terminal region of alpha-dystroglycan." Eur J Biochem **268**(16): 4590-4597.
- Segalat, L. (2006). "Drug discovery: here comes the worm." ACS Chem Biol **1**(5): 277-278.
- Segalat, L. (2007). Invertebrate animal models of diseases as screening tools in drug discovery. ACS Chem Biol. **2**: 231-236.
- Sender, S., G. Gros, *et al.* (1994). "Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase IV in capillaries of rat and human skeletal muscle." J Histochem Cytochem **42**(9): 1229-1236.
- Senf, S. M., S. L. Dodd, *et al.* (2010). "FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70." Am J Physiol Cell Physiol **298**(1): C38-45.
- Sharma, K. R., M. A. Mynhier, *et al.* (1993). "Cyclosporine increases muscular force generation in Duchenne muscular dystrophy." Neurology **43**(3 Pt 1): 527-532.
- Sharp, N. J., J. N. Kornegay, *et al.* (1992). "An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy." Genomics **13**(1): 115-121.
- Shimatsu, Y., K. Katagiri, *et al.* (2003). "Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ)." Exp Anim **52**(2): 93-97.
- Shimura, H., D. Schwartz, *et al.* (2004). "CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival." J Biol Chem **279**(6): 4869-4876.
- Shin, Y., J. Klucken, *et al.* (2005). "The co-chaperone carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) mediates alpha-synuclein degradation decisions between proteasomal and lysosomal pathways." J Biol Chem **280**(25): 23727-23734.
- Sicinski, P., Y. Geng, *et al.* (1989). "The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation." Science **244**(4912): 1578-1580.
- Silversides, C. K., G. D. Webb, *et al.* (2003). "Effects of deflazacort on left ventricular function in patients with Duchenne muscular dystrophy." Am J Cardiol **91**(6): 769-772.
- Singh, N., V. Pillay, *et al.* (2007). "Advances in the treatment of Parkinson's disease." Prog Neurobiol **81**(1): 29-44.
- Sklar, R. M. and R. H. Brown, Jr. (1991). "Methylprednisolone increases dystrophin levels by inhibiting myotube death during myogenesis of normal human muscle in vitro." J Neurol Sci **101**(1): 73-81.
- Skuk, D., M. Goulet, *et al.* (2007). "First test of a "high-density injection" protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up." Neuromuscul Disord **17**(1): 38-46.
- Smith, B. F., Y. Yue, *et al.* (2011). "An intronic LINE-1 element insertion in the dystrophin gene aborts dystrophin expression and results in Duchenne-like muscular dystrophy in the corgi breed." Lab Invest **91**(2): 216-231.

- Song, W. K., W. Wang, *et al.* (1992). "H36-alpha 7 is a novel integrin alpha chain that is developmentally regulated during skeletal myogenesis." J Cell Biol **117**(3): 643-657.
- Song, W. K., W. Wang, *et al.* (1993). "Expression of alpha 7 integrin cytoplasmic domains during skeletal muscle development: alternate forms, conformational change, and homologies with serine/threonine kinases and tyrosine phosphatases." J Cell Sci **106** ( Pt 4): 1139-1152.
- Spence, H. J., A. S. Dhillon, *et al.* (2004). "Dystroglycan, a scaffold for the ERK-MAP kinase cascade." EMBO Rep **5**(5): 484-489.
- Spencer, M. J., D. E. Croall, *et al.* (1995). "Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice." J Biol Chem **270**(18): 10909-10914.
- Spurney, C. F., H. Gordish-Dressman, *et al.* (2009). "Preclinical drug trials in the mdx mouse: assessment of reliable and sensitive outcome measures." Muscle Nerve **39**(5): 591-602.
- St-Pierre, S. J., J. V. Chakkalakal, *et al.* (2004). "Glucocorticoid treatment alleviates dystrophic myofiber pathology by activation of the calcineurin/NF-AT pathway." FASEB J **18**(15): 1937-1939.
- Stitt, T. N., D. Drujan, *et al.* (2004). "The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors." Mol Cell **14**(3): 395-403.
- Stout, A. L., J. Wang, *et al.* (2008). "Tracking changes in Z-band organization during myofibrillogenesis with FRET imaging." Cell Motil Cytoskeleton **65**(5): 353-367.
- Straub, V. and K. P. Campbell (1997a). "Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex." Curr Opin Neurol **10**(2): 168-175.
- Straub, V., J. A. Rafael, *et al.* (1997b). "Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption." J Cell Biol **139**(2): 375-385.
- Street, S. F. (1983). "Lateral transmission of tension in frog myofibers: a myofibrillar network and transverse cytoskeletal connections are possible transmitters." J Cell Physiol **114**(3): 346-364.
- Stupka, N., J. D. Schertzer, *et al.* (2008). "Stimulation of calcineurin Aalpha activity attenuates muscle pathophysiology in mdx dystrophic mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **294**(3): R983-992.
- Sugita, S., F. Saito, *et al.* (2001). "A stoichiometric complex of neuexins and dystroglycan in brain." J Cell Biol **154**(2): 435-445.
- Sugiyama, J., D. C. Bowen, *et al.* (1994). "Dystroglycan binds nerve and muscle agrin." Neuron **13**(1): 103-115.
- Supuran, C. T. (2008). "Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators." Nat Rev Drug Discov **7**(2): 168-181.
- Supuran, C. T. and A. Scozzafava (2000). "Activation of carbonic anhydrase isozymes." EXS(90): 197-219.
- Supuran, C. T., A. Scozzafava, *et al.* (2003). "Carbonic anhydrase inhibitors." Med Res Rev **23**(2): 146-189.
- Talim, B., C. Malaguti, *et al.* (2002). "Vertebral compression in Duchenne muscular dystrophy following deflazacort." Neuromuscul Disord **12**(3): 294-295.
- Talts, J. F., Z. Andac, *et al.* (1999). "Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins." EMBO J **18**(4): 863-870.
- Thioudellet, C., S. Blot, *et al.* (2002). "Current protocol of a research phase I clinical trial of full-length dystrophin plasmid DNA in Duchenne/Becker muscular dystrophies. Part I: rationale." Neuromuscul Disord **12 Suppl 1**: S49-51.
- Tinsley, J., N. Deconinck, *et al.* (1998). "Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice." Nat Med **4**(12): 1441-1444.

- Tinsley, J. M., D. J. Blake, *et al.* (1992). "Primary structure of dystrophin-related protein." *Nature* **360**(6404): 591-593.
- Tinsley, J. M., A. C. Potter, *et al.* (1996). "Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene." *Nature* **384**(6607): 349-353.
- Tintignac, L. A., J. Lagirand, *et al.* (2005). "Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase." *J Biol Chem* **280**(4): 2847-2856.
- Torrente, Y., M. Belicchi, *et al.* (2004). "Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle." *J Clin Invest* **114**(2): 182-195.
- Torrente, Y., G. Camirand, *et al.* (2003a). "Identification of a putative pathway for the muscle homing of stem cells in a muscular dystrophy model." *J Cell Biol* **162**(3): 511-520.
- Torrente, Y., E. El Fahime, *et al.* (2003b). "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) stimulates chemotactic response in mouse myogenic cells." *Cell Transplant* **12**(1): 91-100.
- Torres, L. F. and L. W. Duchen (1987). "The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates." *Brain* **110** ( Pt 2): 269-299.
- Tremblay, P., S. Dietrich, *et al.* (1998). "A crucial role for Pax3 in the development of the hypaxial musculature and the long-range migration of muscle precursors." *Dev Biol* **203**(1): 49-61.
- Turk, R., E. Sterrenburg, *et al.* (2005). "Muscle regeneration in dystrophin-deficient mdx mice studied by gene expression profiling." *BMC Genomics* **6**: 98.
- Turner, P. R., R. Schultz, *et al.* (1993). "Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in mdx muscle." *J Membr Biol* **133**(3): 243-251.
- Urnov, F. D., J. C. Miller, *et al.* (2005). "Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases." *Nature* **435**(7042): 646-651.
- Valentine, B. A., B. J. Cooper, *et al.* (1988). "Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies." *J Neurol Sci* **88**(1-3): 69-81.
- von der Mark, H., J. Durr, *et al.* (1991). "Skeletal myoblasts utilize a novel beta 1-series integrin and not alpha 6 beta 1 for binding to the E8 and T8 fragments of laminin." *J Biol Chem* **266**(35): 23593-23601.
- Vrettou, C., E. Kanavakis, *et al.* (2000). "Molecular studies of beta-thalassemia heterozygotes with raised Hb F levels." *Hemoglobin* **24**(3): 203-220.
- Wagner, K. R., J. B. Cohen, *et al.* (1993). "The 87K postsynaptic membrane protein from Torpedo is a protein-tyrosine kinase substrate homologous to dystrophin." *Neuron* **10**(3): 511-522.
- Wagner, K. R., S. Hamed, *et al.* (2001). "Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations." *Ann Neurol* **49**(6): 706-711.
- Wakefield, P. M., J. M. Tinsley, *et al.* (2000). "Prevention of the dystrophic phenotype in dystrophin/utrophin-deficient muscle following adenovirus-mediated transfer of a utrophin minigene." *Gene Ther* **7**(3): 201-204.
- Walmsley, G. L., V. Arechavala-Gomez, *et al.* (2010). "A duchenne muscular dystrophy gene hot spot mutation in dystrophin-deficient cavalier king charles spaniels is amenable to exon 51 skipping." *PLoS One* **5**(1): e8647.
- Wang, Z., C. S. Kuhr, *et al.* (2007). "Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression." *Mol Ther* **15**(6): 1160-1166.
- Wang, Z., T. Zhu, *et al.* (2005). "Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart." *Nat Biotechnol* **23**(3): 321-328.
- Welch, E. M., E. R. Barton, *et al.* (2007). "PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations." *Nature* **447**(7140): 87-91.
- Welch, W. J. (2004). "Role of quality control pathways in human diseases involving protein misfolding." *Semin Cell Dev Biol* **15**(1): 31-38.

- Weller, B., G. Karpati, *et al.* (1990). "Dystrophin-deficient mdx muscle fibers are preferentially vulnerable to necrosis induced by experimental lengthening contractions." J Neurol Sci **100**(1-2): 9-13.
- Wells, D. J. (2006). "Therapeutic restoration of dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy." J Muscle Res Cell Motil **27**(5-7): 387-398.
- Wetzel, P., T. Kleinke, *et al.* (2002a). "Inhibition of muscle carbonic anhydrase slows the Ca(2+) transient in rat skeletal muscle fibers." Am J Physiol Cell Physiol **283**(4): C1242-1253.
- Wetzel, P., T. Liebner, *et al.* (1990). "Carbonic anhydrase inhibition and calcium transients in soleus fibers." FEBS Lett **267**(1): 66-70.
- Wetzel, P., S. Papadopoulos, *et al.* (2002b). "Inhibition of muscle carbonic anhydrase increases rise and relaxation times of twitches in rat skeletal muscle fibres." Pflugers Arch **443**(5-6): 762-770.
- Wetzel, P., R. J. Scheibe, *et al.* (2007). "Carbonic anhydrase XIV in skeletal muscle: subcellular localization and function from wild-type and knockout mice." Am J Physiol Cell Physiol **293**(1): C358-366.
- Wickner, S., M. R. Maurizi, *et al.* (1999). "Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins." Science **286**(5446): 1888-1893.
- Williams, M. W. and R. J. Bloch (1999). "Extensive but coordinated reorganization of the membrane skeleton in myofibers of dystrophic (mdx) mice." J Cell Biol **144**(6): 1259-1270.
- Willmann, R., S. Possek, *et al.* (2009). "Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy." Neuromuscul Disord **19**(4): 241-249.
- Winand, N. J., M. Edwards, *et al.* (1994). "Deletion of the dystrophin muscle promoter in feline muscular dystrophy." Neuromuscul Disord **4**(5-6): 433-445.
- Winder, S. J., L. Hemmings, *et al.* (1995a). "Calmodulin regulation of utrophin actin binding." Biochem Soc Trans **23**(3): 397S.
- Winder, S. J., L. Hemmings, *et al.* (1995b). "Utrophin actin binding domain: analysis of actin binding and cellular targeting." J Cell Sci **108** ( Pt 1): 63-71.
- Winder, S. J. and J. Kendrick-Jones (1995c). "Calcium/calmodulin-dependent regulation of the NH2-terminal F-actin binding domain of utrophin." FEBS Lett **357**(2): 125-128.
- Xu, Q., L. Yu, *et al.* (2002). "p38 Mitogen-activated protein kinase-, calcium-calmodulin-dependent protein kinase-, and calcineurin-mediated signaling pathways transcriptionally regulate myogenin expression." Mol Biol Cell **13**(6): 1940-1952.
- Yan, J., J. Wang, *et al.* (2003). "AtCHIP, a U-box-containing E3 ubiquitin ligase, plays a critical role in temperature stress tolerance in Arabidopsis." Plant Physiol **132**(2): 861-869.
- Yang, B., D. Jung, *et al.* (1995). "SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2." J Biol Chem **270**(20): 11711-11714.
- Younger, J. M., H. Y. Ren, *et al.* (2004). "A foldable CFTR{Delta}F508 biogenic intermediate accumulates upon inhibition of the Hsc70-CHIP E3 ubiquitin ligase." J Cell Biol **167**(6): 1075-1085.
- Yurchenco, P. D., Y. S. Cheng, *et al.* (2004). "Loss of basement membrane, receptor and cytoskeletal lattices in a laminin-deficient muscular dystrophy." J Cell Sci **117**(Pt 5): 735-742.
- Zeng, X. and M. S. Rao (2008). "Controlled genetic modification of stem cells for developing drug discovery tools and novel therapeutic applications." Curr Opin Mol Ther **10**(3): 207-213.
- Zhang, C., Z. Xu, *et al.* (2005). "CHIP, a cochaperone/ubiquitin ligase that regulates protein quality control, is required for maximal cardioprotection after myocardial infarction in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(6): H2836-2842.

**Anhang****Abkürzungsverzeichnis**

AAV	adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
ACHR	Acetylcholinrezeptor
ACTN3	$\alpha$ -Aktinin-3
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AON	antisense oligo nucleotide
ATPase	Adenosintriphosphatase
BCA	Bicinchoninic acid-basierter Proteinassay
BL10	siehe C57BL/10ScSnOlaHsd
BMD	Becker Muskeldystrophie
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
C57BL/10ScSnOlaHsd	Wildtyp-Mausstamm
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Kation
CA	Carboanhydrase
CAH-4	Carboanhydrase-4 in <i>Cenorhabditis elegans</i>
CD	cluster of differentiation
CD4+	CD4 positiv
CD133+	CD133 positiv
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHIP	carboxy terminus of HSP70 interacting protein
CHN-1	CHIP Homolg in <i>Caenorhabditis elegans</i>
CLSM	konfokale Laserrastermikroskopie
Cn	Calcineurin
CnA $\alpha$ *	Calcineurin A $\alpha$ Transgen
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COOH	Carboxylgruppe
CSA	cross sectional area
CXMDJ	kanines Tiermodell, Beagle-Golden Retriever-Kreuzung
DAB	3,3'-Diaminobenzidin

DAPC	Dystrophin-assoziiertes Proteinkomplex
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCPM	Dichlorophenamid
DFZ	Deflazacort
DGC	Dystroglykankomplex
DIA	Diaphragma
DMD	Duchenne Muskeldystrophie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dko	Knockout
Dp71	Dystrophinisoform 71kDa
<i>dys</i>	Dystrophingen
DZ	Dorzolamid
FoxO	Forkhead box O Transkriptionsfaktor
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	extrazelluläre Matrix
EDL	<i>M. extensor digitorum longus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK-MAP	Extracellular Signal-Regulated Kinase Mitogen-Activated Protein
EtOH	Ethanol
F1-4	Filialgeneration 1-4
FCS	Fötale Kälberserum
GRMD	dystrophes Golden Retriever Tiermodell
H <sup>+</sup>	Proton
HbF	fötale Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HCO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Hydrogencarbonat-Ion
HFMD	hypertrophe feline Muskeldystrophie
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
ID	Identifizierung
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KINDL	ein <i>Fragebogen</i> zur Erfassung der gesundheitsbezogenen <i>Lebensqualität</i> von Kindern
KO	Knockout

MAFbx	muscle Atrophy F-box; Atrogin-1
MB	Megabasen
MDSC	muskel-abgeleitete Stammzellen
<i>mdx</i>	Dystrophin-defizientes Mausmodell
MG-132	Proteasominhibitor
MHC	Myosin heavy chain
min	Minuten
MMg	Myogenin-überexprimierende Maus
mRNA	Boten- (messenger) Ribonukleinsäure
MSC	mesenchymale Stammzellen
MSP	Muskelnebenzellpopulationen
MTJ	myotendinous junction
MTZ	Methazolamid
MuRF1	Muscle RING-finger protein-1
Na <sup>2+</sup>	Natrium-Kation
NaCl	Natriumchlorid
NADH	reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD <sup>+</sup> )
NBT	Nitroblautetrazolium
NCAM	Neuronales Zelladhäsionsmolekül (neural cell adhesion molecule)
neo	Neomycin
NF-AT	nuclear factor of activated T-cells
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated <i>B</i> -cells
NMJ	neuromuskulären Endplatte (neuromuscular junction)
nNOS	Neuronal Nitric Oxide Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
L <sub>o</sub>	optimale Muskellänge im Ruhezustand
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
2OMe	2-O-Methylphosphorothioat
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) Datenbank
P0	Parentalgeneration
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMO	Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligomere
PTC124	Ataluren (3-[5-(2-Fluor-phenyl)-[1,2,4]oxadiazol-3-yl]-benzoesäure)

QC	Qualitätskontrolle
RNAi	RNA Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
S.D.	Standardabweichung
SDH	Succinat Dehydrogenase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	SDS-PAGE SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sol	<i>M. soleus</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TA	<i>M. tibialis anterior</i>
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris Buffered Saline mit 0,1% Tween-20
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	Tetratricopeptid Repeat Motiv
UGC	Utrophin-Glykoproteinkomplex
VC	Varianzkoeffizient
WGA	wheat germ agglutinin
wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

**Danksagung**

Frau Prof. Dr. Marianne Dieterich möchte ich für die Möglichkeit zur Dissertation und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Friedrich-Baur-Institut herzlich danken.

Frau Prof. Dr. Maggie Walter M.A. möchte ich sehr herzlich für die Möglichkeit bei ihr zu promovieren, ihre Geduld und die stets sehr gute Betreuung danken.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Christian Thirion und Frau PD Dr. Dr. Sabine Krause für ihre äußerst kompetente Hilfe und für ihre Ideen und Anregungen während meiner gesamten Doktorarbeit aussprechen.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Hanns Lochmüller für seine fachliche Anleitung, sowie für seine Diskussionsbereitschaft in allen Fragen danken.

Für die Hilfe und Mitarbeit an dieser Arbeit möchte ich mich bei Frau Dana Matzek, Herrn Dr. Rolf Stucka und Maria Schmuck ganz herzlich bedanken.

Allen anderen, aktuellen und früheren Kollegen der AG Prof. Walter - Mandy Heiliger, Dr. Stefanie Bulst, Ursula Klutzny, Uta Stucka, Dr. Sarah Baumeister, Anja Pertl, Wiebke Jahn, Marina Dusl, Christiana Kubny, Sarah Feldkirchner, Dr. Olivia Schreiber, Manuela Zitzelsberger und Irene Kammermeier - möchte ich für die freundschaftliche Atmosphäre und die schöne Zusammenarbeit danken und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für so manches Problem hatten.

Zum Schluss möchte ich die Gelegenheit wahrnehmen, mich ganz herzlich bei denjenigen Menschen zu bedanken, die mich außerhalb des Instituts unterstützt haben – meinen Freunden und ganz besonders meinen Eltern und meiner Familie, die durch ihre Unterstützung meine Ausbildung ermöglicht haben.

## Veröffentlichungen

**Pertl, C.\***, Giacomotto, J.\*, Borrel, C., Walter, M.C., Bulst, S., Johnsen, B., Baillie, D.L., Lochmüller, H., Thirion, C., Ségalat, L. (2009) "Evaluation of the therapeutic potential of carbonic anhydrase inhibitors in two animal models of dystrophin deficient muscular dystrophy." Hum Mol Genet **18**: 4089-4101.

**Pertl, C.**, Pertl, A., Thirion, C., Stucka, R., Patterson, C., Walter, M.C., Krause, H., Lochmüller, H. (2012) "Reduction of the E3/E4 ligase Chip ameliorates functional and morphological signs of muscular dystrophy in dystrophin-deficient mice." Am J Pathol, eingereicht

**Pertl, C.**, Eblenkamp, M., Pertl, A., Pfeifer, S., Wintermantel, E., Lochmüller, H., Walter, M.C., Krause, S., Thirion, C. (2012) "A new web-based method for automated analysis of muscle histology." BMC Musculoskelet Disord **14**: 26.

Bulst, S.\* , Levin, J.\* , Thirion, C., Schmidt, F., Bötzel, K., Krause, S., **Pertl, C.**, Kretzschmar, H., Walter, M. C., Giese, A., Lochmüller, H. (2010) "Divergent molecular effects of desmin mutations on protein assembly in myofibrillar myopathy." J Neuropathol Exp Neurol **69(4)**: 415-424.

## Poster

**Pertl, C.**, Ségalat, L., Walter, M.C., Lochmüller, H., Thirion, C. "Carbonic anhydrase inhibitors' effects on dystrophin-deficient mouse muscle." 53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie und Funktionelle Bildgebung, 26.03. – 28.03.2009 München, Deutschland.

**Pertl, C.**, Ségalat, L., Walter, M.C., Lochmüller, H., Thirion, C. "Carbonic anhydrase inhibitors' effects on dystrophin-deficient mouse muscle." 19. Kongress des Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e. V. (DGM), 04.03.-07.03.2009 Darmstadt, Deutschland.

**Pertl, C.**, Ségalat, L., Walter, M.C., Lochmüller, H., Thirion, C. "Carbonic anhydrase inhibitors' effects on dystrophin-deficient mouse muscle." 13th International Congress of the World Muscle Society (WMS), 29.09.-02.10.2008, Newcastle-Gateshead, UK

**Ehrenwörtliche Erklärung**

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den .....

.....  
(Cordula Pertl)

Dissertation eingereicht am:.....