

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie  
des Universitätsklinikums Halle (Saale)  
(Direktor: Prof. Dr. med. S. Zierz)

**Die C57BL/6 *GNE*<sup>+/-</sup> Maus  
als Modell für die hereditäre Einschlusskörpermyopathie Typ 2  
(h-IBM2)**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Mona Großmann

Geboren am 31. August 1980 in Oranienburg

Gutachter/Gutachterin:

1. Prof. Dr. med. S. Zierz
2. Prof. Dr. med. G. Stoltenburg-Didinger
3. Prof. Dr. med. R. Horstkorte

Eröffnet am: 14.01.2013  
Verteidigt am: 15.02.2016

## Referat

Die h-IBM2 stellt die wohl häufigste Form der hereditären Einschlusskörpermyopathien dar. Ursächlich für die Erkrankung ist eine Mutation im *GNE*<sup>+/-</sup> Gen. Dadurch ist die Funktionsfähigkeit des GNE Enzyms gestört, was eine verminderte Produktion der Sialinsäuren zur Folge hat. Klinisch führt dies zu einer progressiven Muskelschwäche der unteren Extremität, beginnend im frühen Erwachsenenalter.

Schwarzkopf et al. (2002) generierten ein Mausmodell mit einer Mutation im *GNE*<sup>+/-</sup> Gen, das unter anderem eine reduzierte Leistungsfähigkeit gegenüber den C57BL/6 Kontrollmäusen aufwies. Dies war Anlass zu der Annahme, dass es sich bei der betroffenen *GNE*<sup>+/-</sup> Maus um ein Modell der h-IBM2 des Menschen handeln könnte.

Dies galt es zu beweisen. Hierzu wurden folgende Fragestellungen aufgestellt: Sind Merkmale nachweisbar, die ebenfalls bei der h-IBM2 vorkommen? Sind die Merkmale bei betroffenen *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen stärker ausgeprägt als bei gesunden Mäusen? Gibt es altersbedingte Unterschiede?

Insgesamt 38 Mäuse, davon 19 heterozygote *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse und 19 C57BL/6 Kontrollmäuse, wurden in je zwei Gruppen unterteilt. Junge, 24 Wochen alte Tiere und alte, 80 Wochen alte Tiere. Verglichen wurden phenotypische Veränderungen, die Gesamtgewichte sowie die Einzelgewichte von M. gastrocnemius, M. quadriceps femoris und M. tibialis anterior, CK-Werte, die Anzahl der Typ-I-Muskelfasern, Muskelfaserdurchmesser und die Anzahl binnenständiger Kerne. Des Weiteren wurde histologisch und elektronenmikroskopisch nach h-IBM2 charakteristischen Veränderungen wie Einschlusskörperchen und geränderten Vakuolen gesucht. Zusätzlich wurden unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Horstkorte an dem Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg die Sialinsäurelevel beider Gruppen gemessen.

Zusammenfassend führte die im *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell nachgewiesene, moderate Hyposialisierung nicht zur Bildung von Einschlusskörperchen, geränderten Vakuolen oder den für die h-IBM2 charakteristischen, histologischen Merkmalen. Das *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell ist somit kein Modell für die h-IBM2.

Großmann, Mona: Die C57BL/6 *GNE*<sup>+/-</sup> Maus als Modell für die hereditäre  
Einschlusskörpermyopathie (h-IBM2), Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2013

# I. Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	6
1.1	H-IBM .....	6
1.1.1	H-IBM Typ 1 .....	7
1.1.2	H-IBM Typ 3 .....	7
1.1.3	H-IBMPFD .....	7
1.1.4	H-IBMETF .....	8
1.1.5	H-IBM Typ 2 .....	8
1.2	Epidemiologie .....	9
1.3	Klinik .....	9
1.4	Myopathologie .....	10
1.5	Genetik .....	12
1.6	GNE und Pathomechanismus .....	13
1.7	Diagnostik der h-IBM2 .....	15
1.8	Therapeutische Ansätze .....	16
1.9	Pathogenese der h-IBM2 .....	17
1.9.1	Einschlusskörperchen .....	18
1.9.2	Vorkommen und Entstehung der RVs .....	19
1.9.3	Lysosomen und ihre Autophagozytosefunktion .....	20
1.10	Mausmodelle .....	22
1.10.1	GNE M712T/M712T Mausmodell (C57BL/6J Abstammung) .....	23
1.10.2	GNE M712T/M712T Mausmodell (129X1/SvJ ICR Abstammung) .....	23
1.10.3	Das GNE <sup>-/-</sup> hGNED176V-Tg Mausmodell .....	23
1.10.4	Das C57Bl/6 GNE <sup>+/-</sup> Mausmodell .....	25
2	Zielstellung .....	27
3	Material und Methodik .....	29
3.1	Versuchstiere .....	29
3.1.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	29
3.1.2	Tötung der Tiere .....	30
3.1.3	Erfassung des Gewichts einzeln/gesamt .....	30
3.1.4	CK-Bestimmung .....	30
3.1.5	Präparatentnahme .....	31
3.1.6	Auswahl der Muskelproben .....	31
3.1.7	Konservierung und Aufbereitung der Präparate .....	31
3.2	Material .....	32
3.2.1	Chemikalien .....	32
3.2.2	Geräte .....	33
3.3	Methodik .....	34
3.3.1	Bestimmung der Muskelfasertypen: COX/SDH .....	34
3.3.2	Nachweis von RVs: Gomori-Trichrom Färbung (modifiziert) .....	36
3.3.3	Nachweis von binnenständigen Kernen: HE-Färbung .....	38
3.3.4	Nachweis von Amyloid: Kongorot-Färbung mit Kongorotkit nach Highman .....	39
3.3.5	Myofibrilläre ATPase-Reaktion bei pH 9,4 .....	40
3.3.6	Nachweis Saure Phosphatase-positiver Strukturen: Saure Phosphatase Reaktion .....	42
3.3.7	Caveolin 3 Reaktion als Membranmarker .....	43
3.3.8	Nachweis von Einschlusskörperchen: TDP-43 Reaktion .....	45
3.3.9	Auswertung der histologischen Untersuchungen .....	47

3.3.10	Typ-I-Muskelfasern.....	48
3.3.11	Muskelfaserdurchmesser .....	49
3.3.12	Binnenständige Kerne .....	49
3.3.13	RVs.....	50
3.3.14	Elektronenmikroskopie .....	51
3.3.15	Statistische Auswertung .....	52
4	Ergebnisse .....	53
4.1	Äußerer Aspekt/Phänotyp .....	53
4.2	Lauftradergebnisse .....	53
4.3	Auswertung Gewicht.....	54
4.4	CK-Werte .....	55
4.5	Häufigkeitsverteilung von Typ-I-Muskelfasern .....	56
4.6	Beurteilung der Muskelfaserdurchmesser.....	58
4.7	Häufigkeitsverteilung von binnenständigen Kernen .....	62
4.8	Vorkommen von RVs.....	63
4.9	Weitere histologische Charakterisierungen.....	64
4.10	Elektronenmikroskopische Befunde .....	64
4.11	Messung der Sialisierung .....	65
5	Diskussion .....	66
6	Zusammenfassung.....	71
7	Literaturverzeichnis.....	72
8	Thesen .....	78

## II. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ADP	Adenosindiphosphat
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ApoE	Apolipoprotein E
AQP4	Aquaporin-4-Wasserkanals
Aquabidest	zweifach destilliertes Wasser
Aquadest	destilliertes Wasser
Aβ	β-Amyloid
AβPP	β-Amyloid Vorläuferprotein (Amyloid beta precursor protein)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaar
C57BL/6	C57 Black six
CK	Kreatinkinase
CMP-Neu5Ac	N-Glycolylneuraminsäure
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary desoxyribunucleic acid)
COX	Cytochrom C Oxidase
COX/SDH	Cytochrom C Oxidase/Succinat-Dehydrogenase Färbung
DAB	Diaminobenzidin
DMRV	distal myopathy with rimmed vacuoles (Nonaka Disease)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMG	Elektromyographie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FBXO32	Atrogin-1 Ligase (F-Box only protein 32)
g	Gramm
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
<i>GNE</i>	UDP-N-Acetylglucosamine2-Epimerase/N-Acetylmannosamin Kinase Gen
GNE	UDP-N-Acetylglucosamine2-Epimerase/N-Acetylmannosamin Kinase Enzym
H2O2	Wasserstoffperoxid

Hcl	Salzsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin Färbung
hGNE1-8	humane UDP-N-Acetylglucosamine2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase Enzyme 1-8
H-ATPase	Wasserstoff-Adenosintriphosphatase
h-IBM	hereditäre Einschlusskörpermyopathie (hereditary inclusion body myopathy)
h-IBM1	hereditäre Einschlusskörpermyopathie Typ 1 (hereditary inclusion body myopathy typ 1)
h-IBM2	hereditäre Einschlusskörpermyopathie Typ 2 (hereditary inclusion body myopathy typ 2)
h-IBM3	hereditäre Einschlusskörpermyopathie Typ 3 (hereditary inclusion body myopathy typ 3)
h-IBMERF	hereditäre Einschlusskörpermyopathie assoziiert mit frühem respiratorischem Versagen
h-IBMPFD	hereditäre Einschlusskörpermyopathie assoziiert mit Morbus Padget und/oder frontotemporaler Demenz
H-Ionen	Wasserstoff-Ionen
hnRNP	heterogenes, nukleäres Ribonukleoprotein
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
iNOS	inducible nitric oxide Synthase
kb	Kilo-Basenpaar
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LAMP-1	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 1
LAMP-2	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 2
LC3	lysosomales Membranprotein (microtubule associated protein1A/1B-light chain 3)
M	Mittelwert
m : w	männlich : weiblich
M.	Musculus
ManNAc	N-Acetyl-D-Mannosamin
ManNAc Kinase	N-Acetylmannosamin-Kinase
MD	Median
mg	Milligramm
mGNE	UDP-N-Acetylglucosamine2-Epimerase/N-Acetylmannosamin Kinase Enzyme der Maus
MHCIIa	missense Mutation im myosin heavy chain Gen
mm	Millimeter

Mm.	Musculi
mRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure (mitochondrial ribonucleic acid)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NCAM	neuronaies Zelladhäsionsmolekül (Neural Cell Adhesion Molecule)
NcoI	Endodeoxyribonuklease
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
nm	Nanometer
p62	Nukleoporin 62
pCAGGS	bakterielles Plasmid
Pgk	Phosphoglycerate Kinase-1
PHF	paired helical filaments
PMS	Phenazine methosulphate
poly(A)	Polyadenylierung (Anhängen von Adenin-Nukleotiden)
p-Tau	phosphoriliertes Tau
QSM	quadriceps sparing myopathy
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
RV	geränderte Vakuolen (rimmed vacuoles)
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
s-IBM	sporadische Einschlusskörpermyositis (sporadic inclusion body myositis)
SMI-31	monoklonaler Antikörper für Neurofilamente und phosphorilierte Epitope
SMI-310	monoklonaler Antikörper für Neurofilamente und phosphorilierte Epitope
SD	Standardabweichung
Streptavidin-HRP	Streptavidin Meerrettich Peroxidase (streptavidin horseradish peroxidase)
TDP-43	TAR DNA bindendes Protein
TK-Gen	Thymin Kinase Gen
UDP-GlcNAc 2-Epimerase	UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase
VCP	Valosin beinhaltendes Protein (valosin containing protein)
WT	Wildtyp

# 1. Einleitung

Die Einschlusskörpermyopathien gehören zu der Gruppe der neuromuskulären Erkrankungen. Es existieren derzeit sowohl eine sporadische Einschlusskörpermyositis (sporadic inclusion body myositis/s-IBM) als auch verschiedene Subtypen der hereditären Einschlusskörpermyopathie (h-IBM), die sich sowohl in ihrer Klinik als auch im Hinblick auf die Genetik voneinander unterscheiden. Die s-IBM manifestiert sich erst im späten Lebensalter, zumeist nach dem 50. Lebensjahr, und weist entzündliche Infiltrate auf (Eger et al., 2003). Die h-IBMs zeichnen sich durch einen frühen Krankheitsbeginn aus, im Verlauf der Erkrankung treten Muskelschwäche sowie Muskelatrophie auf, deren Lokalisation je nach Subtyp distal oder aber proximal in Erscheinung tritt (Martinsson et al., 2000; Goebel und Fardeau, 2004; Jay et al., 2009; Yardeni et al., 2011).

Sowohl die s-IBM als auch die h-IBMs weisen ähnliche histologische Merkmale wie geränderte Vakuolen (rimmed vacuoles/RVs) und filamentäre Einschlüsse sowie normal bis leicht erhöhte Kreatinkinase-Werte (CK-Werte) auf. Die Einschlusskörpermyopathie Typ 2 (h-IBM2) stellt die häufigste Form der h-IBMs dar (Eisenberg et al., 2001).

## 1.1 H-IBM

Nonaka et al. beschrieben 1981 erstmals an vier japanischen Patienten eine autosomal rezessiv vererbte distale Myopathie, auch distal myopathy with rimmed vacuoles oder Nonaka Disease (DMRV) genannt. Sie tritt hauptsächlich in der japanischen Bevölkerung auf. Der frühe Krankheitsbeginn zwischen dem 20.-26. Lebensjahr (Eger et al., 2003), aber auch die klinischen Symptome ähnelten der 1984 von Argov und Yarom beschriebenen quadriceps sparing myopathy (QSM).

Wie bereits 1995 von Valerie Askanas angenommen (Askanas und Engel, 1995), bestätigte sich später durch genetische Studien, dass das japanische Modell der DMRV sowohl identische histopathologische Merkmale (Murakami et al., 1995) als auch denselben ursächlichen Defekt auf Chromosom 9p1-q1 (Mitrani-Rosenbaum et al., 1996; Askanas, 1997; Ikeuchi et al., 1997) aufwies wie die QSM der jüdischen Bevölkerungsgruppe. Somit erwiesen sich beide Erkrankungen als identisch und wurden derselben Gruppe der h-IBMs zugeordnet, die heute als h-IBM2 bekannt ist.

Der Begriff der h-IBM wurde erstmals 1993 von Valerie Askanas genutzt, um eine Gruppe neuromuskulärer Erkrankungen abzugrenzen, deren pathologische Merkmale denen der s-IBM ähnelten, jedoch keine entzündliche Komponente aufwiesen. Die h-IBMs unterteilen sich mittlerweile in fünf Untergruppen und zählen zu den progressiven Muskelerkrankungen, deren Erbgang sowohl autosomal rezessiv, als auch dominant möglich ist. Während die Ausprägung

klinischer Symptome stark variiert, zeigen die Muskelbiopsien ähnliche Ergebnisse auf (Askanas, 2002). Im Folgenden werden zunächst die autosomal dominant vererbten h-IBM Erkrankungen erklärt.

### **1.1.1 H-IBM Typ 1**

Die h-IBM Typ 1 (hereditary inclusion body myopathy typ 1/h-IBM1) wird autosomal dominant vererbt. Ursächlich hierfür ist ein Defekt im Desmin Gen auf dem Chromosom 2q35 (Goebel und Fardeau, 2004; Lu et al., 2012). Betroffene erkranken zumeist zwischen dem 25.-40. Lebensjahr. Charakteristisch ist eine frühe Muskelschwäche des M. quadriceps femoris sowie eine distale Muskelschwäche, insbesondere des Fußhebers. Im Verlauf kann es ebenfalls zu einer proximalen Muskelschwäche kommen. Die Erkrankung zeigt sich langsam progredient, die Beteiligung des ZNS ist möglich. Die CK-Werte sind normal bis gering erhöht, in den Muskelbiopsien finden sich RVs und multifokale Veränderungen (Goebel und Fardeau, 2004).

### **1.1.2 H-IBM Typ 3**

Die h-IBM Typ 3 (hereditary inclusion body myopathy typ 3/h-IBM3) gehört zu den Myosin Myopathien und folgt ebenfalls einem autosomal dominanten Erbgang. Sie wurde erstmals von Darin et al. (1998) anhand einer schwedischen Familie mit 19 betroffenen Familienmitgliedern beschrieben. Sie zeigt eine missense Mutation im myosin heavy chain Gen (*MHCIIa*) auf Chromosom 17p13.1, das für die schweren Ketten des Myosins kodiert. Das *MHCIIa* ist insbesondere wichtiger Bestandteil für Typ-IIa-Muskelfasern und Hauptbestandteil der extraokkulären Muskulatur (Martinsson et al., 2000; Goebel und Fardeau, 2004).

Betroffene Patienten leiden unter kongenitalen Gelenkkontrakturen, die im Kindesalter regredient, jedoch im Alter von 30-50 Jahren progredient verlaufen. Des Weiteren weisen sie externe Ophthalmoplegien und proximale Muskelatrophien auf, vorrangig den M. pectoralis und den M. quadriceps betreffend (Martinsson et al., 2000; Lu et al., 2012).

Histopathologisch lassen sich desorganisierte Myofilamente im Kindesalter darstellen, während RVs, aber auch 15-21 nm große, zytoplasmatische und intranukleäre Einschlüsse sowie abnorme Veränderungen der Typ-IIa-Muskelfasern zu den typisch adulten Veränderungen zählen (Darin et al., 1998; Jansson et al., 2000; Goebel und Fardeau, 2004).

### **1.1.3 H-IBMPFD**

Die mit Morbus Paget und/oder frontotemporaler Demenz assoziierte h-IBM Erkrankung (h-IBMPFD) folgt einem autosomal dominanten Erbgang und wird durch eine heterozygote Mutation im Valosin beinhaltenden Protein (valosin containing protein/VCP), lokalisiert auf Chromosom 9p13-p12, verursacht (Arhzaouy et al., 2012; Lu et al., 2012). Derzeit existieren mehr als 31 VCP Mutationen weltweit. Durch die Mutation des VCP kommt es zur

Dysregulation verschiedenster Signalwege, beispielsweise sind Autophagosomenreifung und endolysosomaler Abbau gestört, wodurch es zu Ansammlungen von nicht abgebauten Autophagosomen in den Muskelfasern kommt (Ching et al., 2012; Llewellyn et al., 2013).

Die Erkrankung beginnt spät. Bei 90 % der Patienten kann eine progressive Muskelschwäche und Muskelatrophie beobachtet werden, insbesondere den Schultergürtel betreffend. Bei ca. 51% der Betroffenen werden Knochenveränderungen festgestellt, die typischerweise beim Morbus Paget auftreten und 2 % der Patienten bilden eine frontotemporale Demenz aus (Nalbandian et al., 2012). Es sind ebenfalls Phenotypen mit Amyotropher Lateralsklerose (ALS) bekannt (Llewellyn et al., 2013). Die Patienten sterben zumeist zwischen dem 50.-60. Lebensjahr an kardiopulmonalem Versagen (Nalbandian et al., 2012).

Histologisch sind RVs erkennbar, die degenerierte Proteine und membranösen Zellschutt beinhalten und positiv für das TAR DNA bindende Protein-43 (TDP-43) sind. Sie enthalten autophagische und endozytische Marker, wie beispielsweise das Nukleoporin (p62), das lysosomale Membranprotein 3 (microtubule associated protein1A/1B-light chain 3/LC3) und das Lysosomen-assoziierte Membranprotein-2 (LAMP-2) (Ching et al., 2012). Zusätzlich können ubiquitinierte Einschlüsse in den Muskelfasern nachgewiesen werden (Llewellyn et al., 2013).

#### **1.1.4 H-IBMERF**

Für die h-IBM assoziiert mit frühem respiratorischem Versagen (h-IBM with early respiratory failure/h-IBMERF) konnte der Defekt noch nicht lokalisiert werden. Der Erkrankung wird jedoch ebenfalls dominant vererbt und beginnt im Erwachsenenalter, um das 50. Lebensjahr. Sie ist gekennzeichnet durch eine progressive, symmetrische Muskelschwäche des unteren Kompartiments und respiratorisches Versagen (Chinnery et al., 2001; Lu et al., 2012).

Histologisch findet man kongophile und eosinophile Einschlüsse, RVs und Muskelfaserveränderungen, die auf degenerative Prozesse hinweisen, wie beispielsweise gespaltene und fettig degenerierte sowie fibrosierte Fasern (Chinnery et al., 2001; Lu et al., 2012).

#### **1.1.5 H-IBM Typ 2**

Die h-IBM Typ 2 (hereditary inclusion body myopathy Typ 2/h-IBM2), auch bekannt als QSM oder DMRV, stellt die wohl häufigste Form der h-IBM Erkrankungen dar und folgt als einzige der h-IBM Erkrankungen einem autosomal rezessiven Erbgang. Es sind weltweit mehr als 500 erkrankte Patienten bekannt (Yardeni et al., 2011).

Charakteristisch für die h-IBM2 sind der frühe Krankheitsbeginn, die Aussparung des M. quadriceps femoris als auch der prädisponierend wirkende ethnische Hintergrund der Betroffenen (Jay et al., 2009).

## **1.2 Epidemiologie**

Erstmals beschrieben bei der jüdischen Bevölkerung persischer Abstammung aus dem mittleren Osten (Argov und Yarom, 1984) sowie fast zeitgleich an japanischen Patienten als DMRV diagnostiziert (Nonaka et al., 1998), ist die h-IBM2 heute längst nicht mehr begrenzt auf bestimmte ethnische Bevölkerungsgruppen, sondern konnte bei Patienten verschiedenster Abstammung beobachtet werden (Broccolini et al., 2004; Kim et al., 2005; Liewluck et al., 2006). So auch bei zwei Patienten deutscher Abstammung, die allerdings in den USA leben (Eisenberg et al., 2003). Die Prävalenz beträgt bei Patienten persischer Abstammung 1 : 1500 (Tal-Goldberg et al., 2013).

## **1.3 Klinik**

Betroffene erkranken zumeist im frühen Erwachsenenalter, zwischen dem 15.-40. Lebensjahr, durchschnittlich um das 26. Lebensjahr (Sunohara et al., 1989; Nonaka 1998).

Beginnend mit einer progressiven Muskelschwäche der unteren Extremität und früher Beteiligung des M. tibialis anterior gehören Gangstörungen, häufiges Stürzen sowie Schwierigkeiten beim Treppen steigen und Laufen zu den klassischen Erstsymptomen. Während sowohl der M. quadriceps als auch die Gesichts- und Pharyngealmuskulatur selbst im fortgeschrittenen Stadium zumeist ausgespart bleiben, sind M. gastrocnemius, die hintere Oberschenkelmuskulatur, M. sternocleidomastoideus, die parasternale Muskulatur, sowie Hand- und Fingerflexoren betroffen (Nonaka et al., 1998; Malicdan und Nonaka, 2008; Huizing und Krasnewich, 2009). Dennoch gibt es vereinzelt Beobachtungen von atypischen Phenotypen, bei denen Betroffene auch eine Beteiligung des M. quadriceps oder der Gesichtsmuskulatur aufweisen oder aber die untere Extremität wenig bis überhaupt nicht involviert ist (Park et al., 2012).

In der Elektromyographie (EMG) zeigt sich bei den meisten h-IBM2 Patienten eine pathologische Spontanaktivität aus positiven scharfen Wellen, Fibrillationspotentialen und komplex-repetitiven Entladungen. Faszikulationen sind nicht sichtbar. Außerdem lassen sich Hinweise auf chronische Denervierungs- und Reinnervierungsprozesse in Form von polyphasischen und prolongierten Muskelsummenaktionspotentialen nachweisen. Die stärkste Beeinträchtigung zeigte hierbei der M. tibialis anterior (Argov und Yarom, 1984).

Sensibilitätsstörungen treten nicht auf. Ebenso wenig konnte eine kardiale Beteiligung gefunden werden. Die Atemmuskulatur ist selbst bei Patienten mit einer schweren Beteiligung der Extremitätenmuskulatur nur selten betroffen (Nonaka et al., 1998).

Charakteristische, laborchemische Veränderungen gibt es nicht. Die CK-Werte im Serum stellen sich als normal bis maximal fünffach erhöht dar (Malicdan und Nonaka, 2008).

Obwohl das bei der h-IBM2 mutierte Gen UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin Kinase (*GNE*), das bei der Sialinsäureproduktion beteiligt ist, im menschlichen Körper ubiquitär vorkommt, stellt die h-IBM2 keine Systemerkrankung dar.

## 1.4 Myopathologie

Sowohl die Darstellung morphologischer Merkmale der h-IBM2 als auch Unterscheidungsmerkmale zur s-IBM, der häufigsten, sporadisch auftretenden Muskelerkrankung ab dem 50. Lebensjahr (Askanas, 1993), sollen im folgenden Abschnitt aufgezeigt und erläutert werden.

Die histopathologischen Merkmale der h-IBM2 ähneln denen der s-IBM, beide sind gekennzeichnet durch RVs und intranukleäre sowie filamentäre Einschlüsse, die der Erkrankung ihren Namen verleihen (Askanas und Engel, 2003; Li et al., 2013). In den Biopsaten von h-IBM2 Patienten finden sich jedoch keine für die s-IBM typischen entzündlichen Infiltrate, wie beispielsweise die Ansammlung von CD8+ zytotoxischen T-Zellen (Huizing und Krasnewich, 2009). Auch sind keine red-ragged fibers, keine vermehrten Mitochondrien und keine Cytochrom C Oxidase (COX) negativen Fasern nachweisbar (Askanas, 1998; Broccolini et al., 2011).

Die RVs sind leer, granuliert und basophil und können somit sowohl in der Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) als auch in der Gomori-Trichrom Färbung sichtbar gemacht werden (Huizing und Krasnewich, 2009). Sie zeigen sich im Gegensatz zu den RVs der s-IBM selten kongophil, da ihnen Apolipoprotein E (ApoE) sowie einige Epitope des phosphorylierten Tau Proteins (p-Tau) fehlen (Askanas, 1998; Askanas und Engel, 2003). Die wenigen RVs, die sich als kongophil erweisen, erscheinen im Vergleich zu den verschnörkelten Einschlüssen der s-IBM als eher rundliche Ablagerungen (Askanas 1998).

Aufgrund der autophagischen Funktion weisen die RVs Saure Phosphatase Aktivität auf und können somit immunhistochemisch mittels Saure Phosphatase Reaktion nachgewiesen werden (Huizing und Krasnewich, 2009). Des Weiteren reagieren die RVs auf lysosomale Marker wie LAMP-1, LAMP-2 und Kathepsine (Malicdan und Nonaka, 2008; Ching et al., 2012; Li et al., 2013).

Mittels Immunfluoreszenz lassen sich bei der h-IBM2 rundliche Ablagerungen im Zytoplasma nachweisen, die immunreaktiv auf Antikörper gegen das Vorläuferprotein von  $\beta$ -Amyloid (Amyloid beta precursor protein/A $\beta$ PP),  $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ ) und p-Tau sind (Broccolini et al., 2011; Li et al., 2013). Auch konnten kürzlich die Chaperone GRP94, GRP78, Calnexin und Calretikulin, sogenannte Helferproteine aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) mittels doppelt fluoreszenzmarkierter Immunohistochemie in den zytoplasmatischen Ablagerungen dargestellt werden. Diese fanden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu A $\beta$ PP. Mittels Immunoblot konnte eine erhöhte Expression dieser Chaperone nachgewiesen werden (Li et al., 2013). Zusätzlich zeigte sich eine vermehrte Expression der 20S Untereinheiten der Proteasomen, was für eine erhöhte Proteaseaktivität spricht. Auch eine vermehrte Expression von VCP konnte beobachtet werden (Li et al., 2013). Des Weiteren finden sich sowohl bei der h-IBM2 als auch bei der s-IBM vermehrt Marker für Zellstress. Das Alpha B-Crystallin beispielsweise, das hochreguliert wird um toxische Ansammlungen zu verhindern oder die inducible nitric oxide Synthase (iNOS), die häufig bei Entzündungen hochreguliert wird (Fischer et al., 2013). Bei einem einzelnen Patienten ließ sich zusätzlich eine verminderte Expression des Aquaporin-4-Wasserkanals (AQP4) nachweisen (Hoshi et al., 2012).

Veränderungen der Muskelfasern treten sowohl bei der s-IBM als auch bei der h-IBM2 auf. Beispielsweise finden sich bei beiden Erkrankungen in späteren Stadien verstreute, dreieckig konfigurierte und atrophe Fasern als Zeichen der Denervierung (Askanas und Engel, 2003; Broccolini et al., 2011), selten auch nekrotische und regenerierende Muskelfasern, die jedoch nicht für das Ausmaß der h-IBM2 verantwortlich zu sein scheinen (Malicdan et al., 2007). Ausserdem können häufig binnenständige Kerne dargestellt werden (Broccolini et al., 2011).

Die Muskelfaserdurchmesser sind bei der h-IBM2 häufig vergrößert (Broccolini et al., 2011). In den Muskelfasern h-IBM2 erkrankter Patienten sind Größenvariationen von Typ-I- und Typ-II-Fasern erfassbar, wobei Typ-I-Fasern im Verlauf der Erkrankung dominieren (Malicdan und Nonaka, 2008).

Elektronenmikroskopisch zeigen sich sowohl bei der s-IBM als auch bei der h-IBM2 15-20 nm messende, intraplasmatische und intranukleäre filamentäre Einschlüsse, die p-Tau beinhalten (Huizing und Krasnewich, 2009; Broccolini et al., 2011; Li et al., 2013). Ebenso finden sich abnormale Anreicherungen von Proteinen, die ebenfalls mit der Alzheimer Erkrankung in Verbindung gebracht werden. Beispielsweise können die mittels Immunhistochemie nachgewiesenen Proteine A $\beta$ PP und A $\beta$  dargestellt werden (Broccolini et al., 2011; Li et al., 2013). Zusätzlich lassen sich in der h-IBM2 RVs, Zellschutt, proliferierte Golgi Apparate und degenerierte Mitochondrien sowie der Verlust von Myofibrillen beobachten (Malicdan et al., 2007).

## 1.5 Genetik

Die h-IBM2 folgt einem autosomal rezessiven Erbgang, für die Ausprägung des Phänotyps sind somit beeinträchtigte Allele von beiden Elternteilen notwendig (Jay et al., 2009). Ursächlich sind Mutationen am *GNE* Gen, auf Chromosom 9. Dieses spielt eine wichtige Rolle bei der Produktion von Sialinsäure (Mitrani-Rosenbaum et al., 1996; Askanas, 1997; Ikeuchi et al., 1997; Jay et al., 2009).

Die Vererbung erfolgt sowohl homozygot, wenn betroffene Allele identische Mutationen aufweisen, als auch heterozygot, wenn zwei Allele verschiedene Mutationen besitzen. Somit sind Variationen von minimal verminderter bis drastisch reduzierter Aktivität des Enzyms UDP-*N*-Acetylglucosamine 2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase (UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc-Kinase; GNE) möglich, was die Produktion der Sialinsäure mehr oder minder stark beeinflusst. Zunächst konnte phänotypisch kein Unterschied eruiert werden (Penner et al., 2006; Jay et al., 2009), mittlerweile geht man davon aus, dass homozygote Mutationen einen stärker ausgeprägten Phenotyp zur Folge haben als heterozygote Mutationen (Cho et al., 2013).

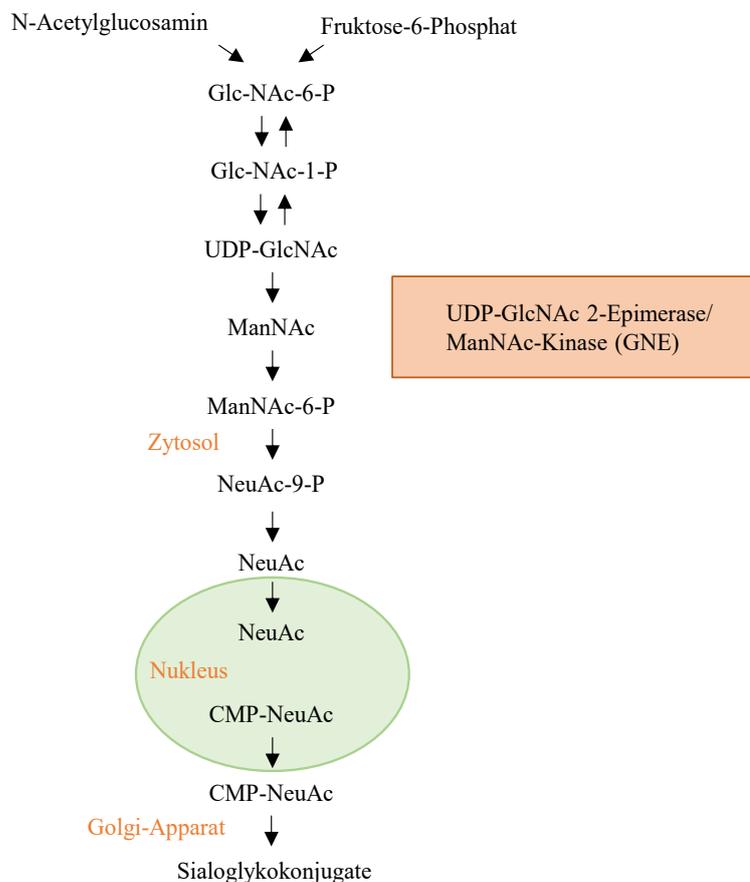
Derzeit existieren mehr als 63 verschiedene Mutationen (Yardeni et al., 2011; Cho et al., 2013). Die bei persischen Juden am häufigsten vorkommende Mutation ist eine missense Mutation und befindet sich auf dem Exon 12 in der Nukleotidposition c.2135 des *GNE* Gens. Sie bewirkt einen Austausch von Methionin durch Threonin am Codon 712 (M712T) (Jay et al., 2009; Broccolini et al., 2011). Die bei den japanischen h-IBM2 Patienten häufig vorkommende Mutation Cp.Val572Leu befindet sich auf dem Exon 9 und konnte sowohl in der Epimerase- als auch in der Kinasedomäne nachgewiesen werden. Sie betrifft 48,3 % aller Allele, wird homozygot vererbt und hat eine schwere Form mit einem früheren Beginn der h-IBM2 zur Folge. Die zweithäufigste Mutation der h-IBM2 in der japanischen Bevölkerung stellt die heterozygote Neumutation p.Asp176Val dar. Sie befindet sich auf dem Exon 3 und betrifft lediglich 22,4 % der Allele. Dadurch beginnt die Erkrankung später und weist einen milderen Verlauf auf (Jay et al., 2009; Cho et al., 2013). In einer kürzlich veröffentlichten, bislang größten Kohortenstudie h-IBM2 betroffener Japaner konnte keine homozygote Nullmutation gefunden werden, so dass davon auszugehen ist, dass diese auch beim Menschen letal verlaufen würde (Cho et al., 2013).

Zwar sorgen die verschiedenen Mutationen für unterschiedlich starke Ausprägungen der Erkrankung, wie genau die *GNE* Mutation die charakteristischen, histologischen und klinischen Merkmale induziert, ist derzeit jedoch noch unklar (Cho et al., 2013). Auch stellt sich die Frage, ob die Mutation im *GNE* Enzym einzig und allein für die Pathogenese verantwortlich zu machen ist, oder lediglich einen von vielen Pathomechanismen darstellt (Broccolini et al., 2011).

## 1.6 GNE und Pathomechanismus

Wie bereits zuvor beschrieben ist bei der h-IBM2 die Funktionsfähigkeit des GNE Enzyms und somit die Produktion von Sialinsäuren im Körper beeinträchtigt (Jay et al., 2009).

Das GNE Enzym ist ein Multimer und konnte bislang im Zytosol, im Nukleus und auch im Golgi Apparat nachgewiesen werden. Es besteht aus zwei funktionellen Domänen, einer und existiert sowohl als Tetramer, mit Epimerase und Kinase-Aktivität, als auch als Dimer, das lediglich Kinaseaktivität besitzt (Stäsche et al., 1997; Krause et al., 2005) Das GNE ist im Zytosol lokalisiert und stellt das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese dar. Sialinsäuren befinden sich an den Enden von Glykokonjugaten (Gagiannis et al., 2007).



**Abb. 1:** Darstellung der Biosynthese von Sialinsäure, die ersten zwei Reaktionen werden katalysiert vom biofunktionalen Enzym GNE (in Anlehnung an Schwarzkopf et al., 2002).

Die Epimerase des GNE Enzyms fungiert bei der Biosynthese der Sialinsäure als limitierendes Enzym und kann mittels negativem Feedbackmechanismus über das Endprodukt, *N*-Glycolylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac), gehemmt werden. Zusätzlich reguliert die Proteinkinase C mittels Phosphorylierung die enzymatische Aktivität (Weidemann et al., 2010). Bislang waren drei verschiedene Isoformen, hGNE1, hGNE2 und hGNE3 des humanen GNE Enzyms bekannt (Reinke et al., 2009). Yardeni et al. (2011) stellten jedoch fünf weitere

Isoformen vor. GNE1 kommt im menschlichen Organismus ubiquitär vor und scheint die wichtigste Funktion bei der Synthese von Sialinsäuren einzunehmen, während hGNE2-8 als gewebsspezifische Regulatoren fungieren und lediglich dem hGNE1 bei der Syntheseleistung assistieren.

Im hGNE1 ist die höchste Epimeraseaktivität nachweisbar, bei hGNE2 ist die Epimeraseaktivität um 80 % reduziert, hGNE3 hingegen weist keine Epimeraseaktivität auf. Alle drei Isoformen (hGNE1-3) besitzen eine hohe Kinaseaktivität. Die Epimeraseaktivität von hGNE4-8 ist nicht sicher nachgewiesen. Allerdings nimmt man an, dass aufgrund des fehlenden Exon 5, das für eine Domäne der Epimerase kodiert, die Epimeraseaktivität eingeschränkt bis gar nicht vorhanden ist (Yardeni et al., 2011).

Die höchsten GNE Konzentrationen ließen sich in Leber und Plazenta nachweisen, da die Leber Syntheseort von Sialinsäuren ist und die Plazenta vermutlich eine große Rolle bei der Sialinsäuresynthese während der Entwicklung spielt (Yardeni et al., 2011). Geringere Konzentrationen sind in Muskel, Gehirn, Niere und Pankreas zu beobachten, wobei die Verteilung des GNE Enzyms abhängig von der Spezies und dem Gewebe ist (Horstkorte et al., 1999; Gagiannis et al., 2007).

Die geringste Konzentration weist der Skelettmuskel auf, dies mag wohl auch die Ursache dafür sein, dass bei der h-IBM2 trotz herabgesetzter Sialinsäurekonzentration in allen Organen lediglich der Skelettmuskel betroffen ist (Yardeni et al., 2011).

Mäuse besitzen zwei Isoformen des Enzyms, mGNE1 und mGNE2. Eine Besonderheit stellt der Nachweis von mGNE2 im Mausmuskel dar, da das hGNE2 im humanen Skelettmuskel nicht nachgewiesen werden konnte. Die GNE Enzyme 1 und 2 von Mensch und Maus sind stark homolog, hGNE1 und mGNE1 sind zu 98,5 %, hGNE2 und mGNE2 zu 96,8 % identisch (Reinke und Hinderlich, 2007).

Die mit Hilfe der GNE synthetisierte Sialinsäure stellt die häufigste terminale Komponente von Oligosaccharideketten auf Glykoproteinen und -lipiden von Eukaryonten dar. Sie reguliert die Stabilität von Glykoproteinen, ist wichtig für Zellkontakte, Zelladhäsion, Signalübertragung, Regeneration, Entwicklung und den Schutz der Zellen. Die GNE ist ebenfalls involviert in die Pathogenese von Erkrankungen. So kann eine erhöhte Sialinsäurekonzentration beispielsweise Hinweise auf Virusinfektionen, Entzündungen, Tumorleiden und metastatische Prozesse geben (Dennis und Laferte, 1987; Vestweber und Blanks, 1999; Matrosovich und Klenk, 2003; Gagiannis et al., 2007). Eine verminderte Sialisierung hingegen führt zum Zelltod durch fehlende Migration und Differenzierung oder durch fehlende Abwehr von proteolytischen Prozessen (Schwarzkopf et al., 2002). Die Inaktivierung des GNE Enzyms mittels Gen-targeting bei Mäusen führt bereits im Embryonalstadium zum Tode (Schwarzkopf et al., 2002).

Neben der h-IBM2 kann durch Mutationen im *GNE* Gen auch die Erkrankung Sialuria, ebenfalls bekannt als french type sialuria, hervorgerufen werden. Die Sialuria wird autosomal dominant vererbt, der Defekt liegt auf Chromosom 9p13.3 und hat eine Inhibition in der allosterischen Region der Epimerase zur Folge. Der allosterische Bereich ist der Bereich eines Enzyms, der durch Bindung eines Effektors eine Konformationsänderung zur Folge hat. Durch die Mutation ist der negative Feedback Mechanismus gestört, dies führt zu einer gesteigerten Aktivität der UDP-GlcNAc 2-Epimerase und somit zu vermehrter Produktion der Sialinsäuren. Ebenfalls kommt es zu einer vermehrten renalen Ausscheidung von N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), der häufigsten Sialinsäure, N-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc), einem Vorläufer der Sialinsäuren, N-Acetylglucosamin (GlcNAc), einem Bestandteil der UDP-GlcNAc 2-Epimerase und Acetamidoglucal, einem Sialinsäuremetaboliten. Das massiv überproduzierte Neu5Ac akkumuliert im Zytoplasma und führt letztendlich unter anderem zu Hepatomegalie, mikrozytärer Anämie, vermehrt auftretenden Infektionen der oberen Atemwege und Entwicklungsverzögerungen (Seppala et al., 1999; Enns et al., 2001; Leroy, 2004; Penner et al., 2006; Reinke et al., 2009).

## 1.7 Diagnostik der h-IBM2

Die Diagnostik der h-IBM2 basiert sowohl auf klinischen als auch auf histopathologischen Merkmalen. Valerie Askanas (1998) empfiehlt zur Diagnostik histopathologischer Merkmale die Durchführung verschiedener Färbungen, die im Folgenden aufgeführt werden.

Zur Darstellung von RVs in den Muskelzellen, aber auch zum Ausschluss entzündlicher Infiltrate, wie sie typischerweise bei der s-IBM vorkämen, sollte das Präparat laut Askanas et al. (1993) mit Gomori-Trichrom angefärbt werden, zur Visualisierung von Amyloid sollten Kristallviolett oder Kongorot verwendet werden. Zur verbesserten Darstellung der Kongorotpräparate sollten diese unter Anwendung eines Rhodaminfilters unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Charakteristischerweise kann Amyloid jedoch bei der h-IBM2 schwer oder garnicht nachgewiesen werden, wohingegen Muskelpräparate von s-IBM Patienten häufig Amyloid aufweisen.

Für den Nachweis von Filamenten oder p-Tau sollten laut Askanas et al. (1998) immunhistochemische Färbungen unter Verwendung der monoklonalen Antikörper SMI-31 und SMI-310 durchgeführt werden. Diese haben sich aufgrund der niedrigen Sensitivität jedoch nicht durchsetzen können (Hilton-Jones et al., 2010). Zum Nachweis phagozytotischer Prozesse innerhalb der RVs bedient man sich der Saure Phosphatase Reaktion als lysosomalem Marker. Elektronenmikroskopische Untersuchungen, die multilamelläre Strukturen darstellen, gelten noch immer als Goldstandard. Des Weiteren finden sich unter dem Elektronenmikroskop zytoplasmatische als auch nukleäre Einschlüsse, die Bestandteile von Zellmembranen,

Tubulofilamente und Zellschutt enthalten. RVs lassen sich mittels HE-Färbung als basophile Strukturen darstellen, in der Gomori-Trichrom Färbung sind sie rot angefärbt, auch mittels Elektronenmikroskop sind sie visualisierbar (Huizing und Krasnewich, 2009).

Immunhistochemisch läßt sich ein normales Zytoskelett darstellen, allerdings kann das neuronale Adhäsionsmolekül NCAM1 (Neural Cell Adhesion Molecule), das im normalen Muskel nicht, in regenerierenden Fasern häufig visualisierbar ist, nachgewiesen werden (Huizing und Krasnewich, 2009).

## 1.8 Therapeutische Ansätze

Bislang gibt es keine erfolgreiche und vielversprechende Therapie für die h-IBM2. Im Gegensatz zur s-IBM geht die h-IBM2 wie bereits erwähnt nicht mit Entzündungszeichen einher, somit wirken weder Kortikoide noch Plasmapheresemaßnahmen, auch andere immunsuppressive Therapien sind wenig effizient. Es existieren jedoch verschiedene Therapieansätze, wie beispielsweise diätetische Maßnahmen, Immunglobulingabe oder die Verabreichung eines funktionsfähigen *GNE* Gens, die im Folgenden erläutert werden.

Eine alkoholarme Diät wird wegen der Förderung der Hydrolyse von Sialinsäuren ebenso empfohlen wie das Vermeiden von übermäßigem Verzehr an zink-, selen- und kupferhaltigen Lebensmitteln, die die Aktivität des GNE Enzyms mindern. Zudem sollte Magnesium substituiert werden, weil es einen entscheidenden Co-Faktor des Enzyms darstellt (Huizing und Krasnewich, 2009).

Einen invasiveren Ansatz verfolgt die Gabe von Immunglobulinen. Diese enthalten Sialinsäuren, was zu der Annahme führte, sie könnten die verminderte Konzentration an Sialinsäuren bei h-IBM2 Betroffenen ausgleichen. 2007 wurden vier h-IBM2 Patienten am National Institute of Health (NIH Clinical Center, Bethesda MD, USA) über einen Zeitraum von einem Monat mit Immunglobulinen therapiert, sie bekamen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen 1 g/kg IgG i.v., danach jeweils dreimal 400 mg/kg in wöchentlichen Intervallen. Obwohl eine subjektive und objektive Verbesserung der Muskelkraft erreicht werden konnte, blieben eindeutige immunologische und histologische Beweise für die Wirksamkeit der Therapie und den positiven Effekt auf die Sialisierung aus. Die Patienten zeigten zudem die unter i.v. Gabe von Immunglobulinen bekannten Nebenwirkungen (Sparks et al., 2007).

Nemunaitis et al. (2011) therapierten eine sich im fortgeschrittenen Stadium der h-IBM2 befindliche Patientin über 24 Monate hinweg mit der Gabe eines funktionsfähigen Lipoplex *GNE* Gens. Die Betroffene erhielt sieben Dosen im Abstand von jeweils 60 Tagen in aufsteigender Dosis von 0,4 mg-7 mg i.v. Es konnte ein nachweisbarer Anstieg der Sialisierung an Oberflächenproteinen sowie eine geringe Verbesserung der Muskelstärke erreicht werden, die subjektiv zur Verbesserung des täglichen Lebens führte (Nemunaitis et al., 2011).

Auch Nishino und Noguchi (2012) konnten durch in vivo und in vitro Tests eine positive Wirkung zugeführter Sialinsäuren nachweisen. Durch die orale Gabe von Sialinsäuren, Vorläufern von Sialinsäure oder Sialyllactose konnten deutliche Erfolge sowohl bei Mäusen als auch im Phase-I Versuch erzielt werden.

Tal-Goldberg et al. (2013) haben kürzlich die missense Mutation M712T, die bei Patienten persischer Abstammung am häufigsten vorkommt, durch ein Trans-splicing Verfahren korrigiert. Die Testungen erfolgten in vitro an Mauszellen und menschlichen Zellen, in vivo Testungen sollen folgen.

Viele der therapeutischen Ansätze sind im Einzelnen noch nicht hinreichend erforscht und getestet, dennoch erscheinen einige vielversprechend und könnten in naher Zukunft die Therapie der h-IBM2 ermöglichen.

## 1.9 Pathogenese der h-IBM2

Die Pathogenese der h-IBM2 ist weitestgehend unklar. Bislang ist nicht bekannt, warum die Erkrankung ausbricht und welche Triggerfaktoren involviert sind. Man geht im Wesentlichen davon aus, dass durch die Mutation im *GNE* Gen und die daraufhin reduzierte Produktion des *GNE* Enzyms sowie die daraus resultierenden, reduzierten Sialinsäurelevel instabile und in ihrer Funktion eingeschränkte Glykoproteine entstehen. Aufgrund dessen kommt es zu einer Degeneration der Muskelzellen, charakterisiert durch RVs und intranukleäre sowie tubulofilamentäre Einschlüsse, die letztendlich zu einer Funktionseinschränkung beziehungsweise einem Funktionsverlust des Muskels führen (Malicdan et al., 2008; Li et al., 2013). Unklar ist jedoch, warum es lediglich im Skelettmuskel zur Funktionseinschränkung und Degeneration kommt. Reagiert der Skelettmuskel anfälliger auf Störungen, weil im Verhältnis zu Leber, Niere oder Lunge relativ niedrige Sialinsäurelevel messbar sind (Broccolini et al., 2011; Yardeni et al., 2011)? Oder gibt es gar skelettmuskelspezifische Stoffwechselprozesse, die bislang noch nicht entdeckt wurden (Broccolini et al., 2009)?

Zu den Hauptmerkmalen der h-IBM2 gehören die Einschlüsse und Ablagerungen im Zytoplasma und im Nukleus (Malicdan et al., 2008, Broccolini et al., 2011; Sela et al., 2011). Wie bereits im Kapitel Myopathologie erwähnt, bestehen diese aus degenerierten Proteinen, Mitochondrien, VCP, A $\beta$ PP, A $\beta$  und p-Tau. In unmittelbarer Nachbarschaft dazu werden Chaperone aus dem ER vermehrt exprimiert (Li et al., 2013). Da pathologische Ansammlungen oder missgefaltete Proteine die Funktion des ER gefährden, findet kompensatorisch eine Überexpression von Chaperonen statt, die die Kapazität des ER erhöht, so dass vermehrt Proteine hergestellt werden und dementsprechend mehr missgefaltete Proteine oder Ablagerungen ins Zytoplasma transportiert werden können (Li et al., 2013). Durch fehlgefaltete Proteine und Ablagerungen, aber auch durch ER-Stress werden das Proteasomensystem und die

Autophagozytose aktiviert, zusätzlich sorgt die Überexpression von VCP für einen schnelleren Transport vom ER ins Zytoplasma und somit für einen schnelleren Abbau (Li et al., 2013).

Des Weiteren lassen sich RVs darstellen, die elektronenmikroskopisch aus autophagischen Vakuolen bestehen und die Ursache der Muskelatrophie sein könnten (Malicdan et al., 2008).

Die sich in der Umgebung der RVs befindlichen desorganisierten Myofibrillen aber auch Zellschutt, scheinen Autophagosomen zu aktivieren. Auch non-lysosomale ATP-Ubiquitin Proteasomen scheinen involviert zu sein, da vermehrte Proteasomenaktivität in den RVs als auch in der Umgebung nachgewiesen wurden (Malicdan und Nonaka, 2008).

Die häufig in der Umgebung nachgewiesenen Amyloidablagerungen gehen wahrscheinlich der Degeneration und den Ansammlungen der RVs voraus (Malicdan und Nonaka, 2008).

Möglicherweise stellen die RVs jedoch lediglich eine Randerscheinung einer metabolischen Störung auf subzellulärer Ebene dar, die eben nicht nur auf eine Synthesestörung der Sialinsäure zurückzuführen ist (Broccolini et al., 2009).

Nachfolgend werden die Entstehung und das Vorkommen von Einschlusskörperchen, RVs, aber auch Lysosomen und deren Funktion bei der Autophagozytose beschrieben.

### **1.9.1 Einschlusskörperchen**

Einschlusskörperchen sind Multiproteinaggregate, die sich sowohl lichtmikroskopisch mittels Kongorotfärbung, Thioflavin S und Kristalviolett als auch elektronenmikroskopisch darstellen lassen (Askanas, 2001; Askanas und Engel, 2003; Nakamori et al., 2013). Sie imponieren sowohl bei der s-IBM als auch bei der h-IBM2 als intranukleäre und intrazytoplasmatische, tubulofilamentäre Einschlüsse und sind amyloid-positiv (Malicdan und Nonaka, 2008; Broccolini et al., 2009; Huizing und Krasnewich, 2009). Im Gegensatz zur s-IBM sind die Einschlüsse der h-IBM nicht kongophil, ausserdem fehlen einige Epitope von p-Tau und ApoE (Askanas und Engel, 2003).

Askanas und Engel (2003) beschreiben zwei verschiedene Einschlusskörperchen. Zum einen plaqueähnliche, rundliche Filamente, die hauptsächlich A $\beta$  beinhalten und einen Durchmesser von 6-10 nm aufweisen, so genannte Amyloid-Einschlusskörperchen. Zum anderen linienförmige und verschnörkelte Tubulofilamente (paired helical filaments/PHFs), die p-Tau enthalten.

In nachfolgenden Publikationen werden jedoch ausschließlich die PHFs beschrieben und analysiert. Sie enthalten neben p-Tau auch degenerierte Membranprodukte und Zellkerne, in Form und Größe veränderte Mitochondrien und zytoplasmatische Tubulofilamente. Sie haben einen Durchmesser von ca. 15-21 nm und enthalten kein A $\beta$  (Huizing und Krasnewich, 2009; Malicdan und Nonaka, 2008; Broccolini et al., 2011; Lu et al., 2012).

In unmittelbarer Nachbarschaft der Einschlüsse können ebenfalls degenerierte Strukturen nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass die nukleäre Degeneration der myofibrillären Degeneration und der Autophagie vorausgeht. Ähnlich wie bei den RVs geht man davon aus, dass die Einschlüsse apoptoseassoziiert auftreten (Malicdan und Nonaka, 2008).

Die Ursachen dieser umschlossenen Ansammlungen sind derzeit noch nicht gänzlich erforscht. Askanas und Engel (2002) gehen davon aus, dass die Bindung zu Polypeptiden mit inkorrekt gefalteten Proteinen zu zytoplasmatischen aber auch nukleären Ablagerungen führt. Ein möglicher Grund hierfür kann beispielsweise oxidativer Stress sein, der bei der h-IBM2 erhöht ist. Aber auch Proteasomeninhibition, ER-Stress und der Zerfall lysosomaler Strukturen werden als Ursache vermutet (Nakamori et al., 2013).

### **1.9.2 Vorkommen und Entstehung der RVs**

RVs sind typischerweise bei der h-IBM und s-IBM zu finden, dennoch kommen sie unter anderem auch in Dystrophien, Myopathien, metabolischen Syndromen oder auch im Marinesco-Sjogren Syndrom vor, sind somit unspezifisch. Sie finden sich charakteristischerweise in histologisch aufbereiteten Muskelbiopsien, die als Gefrierschnitte bearbeitet werden (Nonaka et al., 1998; Malicdan und Nonaka, 2008).

Bei der s-IBM enthalten die RVs im Rahmen histologischer Beobachtungen in der Gomori-Trichrom Färbung zumeist rötliches bis grau-violettes Material, was ihnen in der Vergangenheit die Bezeichnung RVs verschaffte. Bei der h-IBM2 hingegen präsentieren sie sich als leere Vakuolen (Askanas, 2002).

Die RVs befinden sich zumeist in kleinen, atrophischen Fasern. Ihr Inhalt, ursprünglich von zytoplasmatischen Organellen oder Zellmembranen der Muskelfasern abstammend, besteht aus degenerierten Mitochondrien, Glykogengranula, Zellmembranfragmenten, tubulomembranösen Strukturen und amorphem Zellschutt. Innerhalb der RVs und im Randbereich befinden sich Saure Phosphatase sowie spezifische Esterase, aber auch Kathepsin B, Kathepsin L, Calpain, eine intrazelluläre kalziumabhängige Protease, Ubiquitin,  $\beta$ APP, A $\beta$  und p-Tau (Kumamoto et al., 1994; Kumamoto et al., 1998; Malicdan und Nonaka, 2008). Das TDP-43 konnte ebenfalls dargestellt werden (Hoshi et al., 2012; Llewellyn et al., 2013).

Durch den Nachweis von Esterasen und Saurer Phosphatase, aber auch aufgrund von endozytotischen und autophagischen Marker wie p62, LC3 und LAMP-2 wurde den RVs die Eigenschaft von Lysosomen zugewiesen (Ching et al., 2012).

Zusätzlich geben immunhistochemisch nachgewiesene Bestandteile wie alpha-Aktinin, Aktin und Myosin Aufschluss über stattgefundenen Phagozytose der Myofibrillen innerhalb der RVs (Kumamoto et al., 1994). Malicdan und Nonaka (2008) nahmen an, dass die RVs durch

degenerierte Proteine aktiviert werden, um die in der Nachbarschaft befindlichen, desorganisierten Myofibrillen zu phagozitieren. Li et al. (2013) hingegen gehen davon aus, dass es durch die Hyposialisierung zu fehlgefalteten Proteinen kommt. Diese werden dann durch das ER ins Zytoplasma geschleust. Hier entstehen pathologische Ansammlungen dieser Proteine, die das Ubiquitin-Proteasomsystem aktivieren. Die genaue Pathogenese der RVs in der h-IBM2 ist bislang jedoch nicht geklärt.

### **1.9.3 Lysosomen und ihre Autophagozytosefunktion**

Lysosomen sind membranumschlossene, mit hydrolytischen Enzymen gefüllte Kompartimente, in allen eukaryontischen Zellen auffindbar und stark in Form und Größe variierend. Sie wurden ursprünglich durch biochemisches Trennen der Zelle entdeckt, später erst gelang der Nachweis mittels Elektronenmikroskopie (Alberts et al., 2004).

Sie bestehen aus ca. 40 verschiedenen sauren Hydrolasen, wie beispielsweise Proteasen, Nukleasen, Glukosidasen, Lipasen, Phospholipasen, Phosphatasen und Sulfatasen. Ihre spezielle Zellmembran ermöglicht es ihnen, sich vor den im Inneren befindlichen lysosomalen Proteasen zu schützen und Teile verdauter Makromoleküle wie Aminosäuren, Zucker und Nukleotide ins Zytosol zu transportieren. Diese können dann wiederverwendet oder ausgeschieden werden. Um den für die Aktivität der hydrolytischen Enzyme benötigten sauren pH-Wert von 4,5-5,0 zu erreichen, bedienen sich Lysosomen der H-ATPase, die H-Ionen ins Innere befördert (Alberts et al., 2004)

Lysosomen können sowohl extrazelluläre Bestandteile mittels Endozytose oder Phagozytose aufnehmen und verdauen, als auch intrazellulär im Rahmen der Autophagozytose tätig werden.

Bei der Endozytose werden extrazelluläre Moleküle den frühen Endosomen zugeführt und dort mit Hilfe von Hydrolasen abgebaut. Einige Moleküle können wiederverwertet und zur Plasmamembran transportiert, andere an späte Endosomen übergeben werden. Aus diesen entstehen durch verschiedene Reifungsprozesse ausgereifte Lysosomen, die schließlich einen pH-Wert von 4,5-5 aufweisen (Alberts et al., 2004).

Die Phagozytose hingegen wird lediglich von spezialisierten Phagozyten wie Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten durchgeführt, die sich auf den Abbau großer, extrazellulärer Partikel, Bakterien oder Viren spezialisiert haben. Hierbei kommt es nach Aufnahme in die Zelle zu einer Umschließung des zu verdauenden Objekts und anschließender Bildung eines Phagosoms, das sich ähnlich wie bei der Autophagozytose in ein Lysosom umwandelt (Alberts et al., 2004).

Die Autophagozytose, auch Autophagie genannt, ist die einzige Form des Abbaus intrazellulärer Kompartimente durch Lysosomen. Die Lysosomen stellen hierbei die Endpunkte verschiedener

Abbauprozesse wie beispielsweise der Endozytose, Phagozytose, Pinozytose oder Autophagie dar (Sandri et al., 2013). Es ist ein wichtiger und komplex regulierter Prozess, der in allen Zellen stattfindet. Hierbei werden überschüssige oder degenerierte Organellen, zumeist infolge von Überlastung, Mangelzuständen oder Zellschädigungen entfernt. Zudem sichert die Autophagozytose den Erhalt der grundlegenden Zellfunktion und des Gleichgewichts, beispielsweise in nährstoffarmen Zeiten. So können in Fastenzeiten Zellorganellen und große Teile des Zytoplasmas mittels Autophagozytose umschlossen und mit Hilfe der durch vorherige Verdauung entstandenen Stoffwechselprodukte ernährt werden. Eine ebenso wichtige Rolle spielt die intrazelluläre Verdauung für die Entwicklung und Gesundheit, da bei der Differenzierung und Restrukturierung der Zellen nicht mehr benötigtes Material mittels Autophagozytose entsorgt wird. Zudem hilft die Autophagozytose bei der Bekämpfung von Viren und Bakterien und ist im Gegensatz zu Proteasomen geeignet auch große Organellen oder Bestandteile von Proteinen zu verdauen (Alberts et al., 2004).

Das abzubauen Substrat kann auf unterschiedliche Weise degradiert werden. Beispielsweise über Chaperon-vermittelte Autophagie, mittels Makrophagozytose, die Organellen und Zytoplasmabestandteilen degradiert oder mittels Mikroautophagie, die kleinere Anteile des Zytoplasmas abbaut (Sandri et al., 2013).

Die zu verdauenden Zytoplasmaanteile werden umschlossen und mittels Doppelmembran abgedichtet. Anschließend fusioniert das Kompartiment mit den Lysosomen, hierbei werden lysosomale Enzyme in das entstandene Autophagosomen eingeschleust. Danach kommt es zur Verdauung des Inhalts und der inneren Membran des Autophagosoms (Alberts et al., 2004; Pavelka und Roth, 2005).

Insbesondere die Makroautophagie ist wichtig für den Muskel. Ist diese in ihrer Funktion beeinträchtigt oder findet ein vermehrter Abbau von Organellen statt, so führt dies zur Muskelfaserschädigung und zu autophagischen Ablagerungen (Sandri et al., 2013).

Das ubiquitinabhängige Proteasomsystem stellt einen weiteren, sehr bedeutenden, proteolytischen Abbaumechanismus dar. Es ist wichtig für die Qualitätskontrolle von Proteinen.

Hierfür ist eine kovalente Bindung durch das Ubiquitin an das abzubauen Substrat notwendig, um von dem Proteasom erkannt und im Anschluss abgebaut zu werden (Sandri et al., 2013).

Zunächst wird das sehr kleine Ubiquitin Protein durch ein ATP-abhängiges Enzym aktiviert, es entsteht ein Ubiquitin gepaartes Enzym. Mittels Ubiquitin-Ligase wird das Protein an das Substrat gebunden und es entsteht eine Ubiquitinkette am abzubauen Zielprotein. Dieser Schritt ist limitierend und beeinflusst die Kinetik im Proteinabbau. Es existieren im Muskel zwei spezifische Ubiquitin-Ligasen, die Atrogin-1 Ligase (F-Box only protein 32/FBXO32) und die Muskel RING Finger-1, auch als E3 Ubiquitin-Protein Ligase bekannt (Sandri et al., 2013).

Die Ligasen stellen wichtige Marker zur Erkennung einer Muskelatrophie dar. Mäuse, denen beispielsweise eine der Ligasen fehlt, können keine Atrophie ausbilden (Sandri et al., 2013).

Durch die mittels Ligase befestigte Ubiquitinkette wird das Protein nun von einem 26S Proteasoms erkannt und kann abgebaut werden. Im Anschluss wird durch ein weiteres Enzym die Ubiquitinkette entfernt und recycelt (Sandri et al., 2013).

## 1.10 Mausmodelle

Derzeit existieren vier verschiedene Mausmodelle mit unterschiedlichen *GNE* Genotypen und mausspezifischer Herkunft (Schwarzkopf et al., 2002; Salama et al., 2005; Gagiannis et al., 2007; Galeano et al., 2007; Malicdan et al., 2007; Malicdan, 2008). Die Tiere mit der *GNE* M712T/M712T Mutation (C57BL/6-Abstammung) und der *GNE* M712T/M712T Mutation (129X1/SvJ ICR-Abstammung) versterben aufgrund eines Nierenversagens zumeist sehr früh, zudem zeigen sie keine Auffälligkeiten im Skelettmuskel. Tiere des Mausmodells *GNE*<sup>-/-</sup> h*GNED176VL*-Tg hingegen überleben länger und scheinen ähnliche Pathologien aufzuweisen wie Betroffene der h-IBM2 (Galeano et al., 2007; Udd, 2009).

Die Tiermodelle beruhen auf dem gleichen Prinzip. Mit Hilfe der Genmanipulation ist es möglich Gene zu beeinflussen, beispielsweise zu deaktivieren. Hierzu benötigt man embryonale Stammzellen, gewonnen aus Blastozysten eines Inzuchtstammes, die in die Keimbahn eingebracht werden. Sowohl bei Knock-in als auch Knock-out Mäusen bekommen die in vitro vermehrten Stammzellen mittels Elektroporation, die die Zellmembran permeabel für einzuschleusende DNA macht, einen künstlich erzeugten Ziel- bzw. Targetingvektor übertragen. Dieser besteht aus vier Bereichen, einem zentralen Abschnitt, der sowohl das Zielexon als auch die Genveränderung beinhaltet, einem Selektionsmarker und angrenzenden Homologiebereichen, die sich dem veränderten Exon anschließen und für die exakte Platzierung des Vektors in der Stammzelle sorgen (Graw, 2007).

Der Austausch zwischen den DNA Abschnitten erfolgt mittels homologer Rekombination, der künstliche Vektor findet die Sequenz in der Zielzelle, so dass eine Rekombination zwischen den identischen Sequenzen stattfinden kann. Die Zielsequenz wird im Knock-out Modell durch den künstlichen Targetingvektor ersetzt, im Knock-in Modell wird eine zusätzliche Mutation eingefügt (Graw, 2007; Mata et al., 2012).

Die rekombinierten Stammzellen werden nun in die isolierte Blastozyste von Spendermäusen injiziert und im Anschluss in pseudoschwangere Ammentiere implantiert (Graw, 2007).

Die Tiere des C57BL/6 *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodells wurden im Rahmen dieser Arbeit auf Vergleichbarkeit zur h-IBM2 des Menschen getestet. Nachfolgend werden alle vier Mausmodelle beschrieben.

### **1.10.1 GNE M712T/M712T Mausmodell (C57BL/6J Abstammung)**

Im *GNE* M712T/M712T Modell enthält der mausspezifische Ziel- bzw. Targetingvektor die bei persischen Juden vorkommende Mutation M712T, die mittels homologer Rekombination in embryonale Stammzellen vom C57BL/6J Stamm eingebracht wurden (Galeano et al., 2007).

Die homozygoten *GNE* Gen targeting Knock-in Mäuse starben bis auf eine männliche Ausnahme innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Geburt. Sie zeigten eine starke glomeruläre Hämaturie und Podozytopathien (Galeano et al., 2007).

Im Embryonalstadium konnten keine Auffälligkeiten hinsichtlich des äußeren Erscheinungsbildes, der Kopf- und Körpermaße sowie der respiratorischen Funktion entdeckt werden. Nach der Geburt jedoch waren die betroffenen, homozygoten *GNE* Mäuse kleiner und leichter als ihre Artgenossen und zeigten erhöhte Proteinwerte im Urin. Es imponierten keine Muskelpathologien, weder klinisch noch immunhistochemisch, was im frühen Stadium der h-IBM2 ebenfalls nicht vorkommt. Allerdings zeigten betroffene Mäuse im Gegensatz zu betroffenen h-IBM2 Patienten einen letalen, renalen Phenotyp mit hämorrhagischen Nieren und Proteinurie. Elektronenmikroskopisch waren beeinträchtigte Podozyten in den Glomerula der Niere und eine beschädigte, glomeruläre Basalmembran erkennbar. Zudem ließ sich durch Podocalyxin, dem größten Sialoglykoprotein der apikalen Membran, das einen podozytenspezifischen Marker darstellt, eine stark reduzierte Sialisierung bei den mutierten Mäusen nachweisen (Galeano et al., 2007).

### **1.10.2 GNE M712T/M712T Mausmodell (129XI/SvJ ICR Abstammung)**

Ein weiteres, dem von Galeano et al. veröffentlichten Modell ähnliches Knock-in Mausmodell wurde unter der Leitung von Ilan Salama kreiert und imitiert ebenfalls die persisch-jüdische M712T Mutation mittels homologer Rekombination. Als Grundlage dienten hier Stammzellen des 129XI/SvJ ICR Stammes. Auch hier gab es bereits in der neonatalen Phase letale Verläufe aufgrund von Nierenversagen, allerdings überlebten mehr Mäuse die neonatale Phase als im oben genannten Modell (Udd, 2009).

Homozygote Kinase Mutationen rufen mehr oder weniger ausgeprägte Phänotypen hervor, die Überlebensrate ist abhängig von der Ausprägung. Das älteste, einen milden Verlauf aufweisende Tier, überlebte acht Monate (Udd, 2009).

### **1.10.3 Das GNE<sup>-/-</sup> hGNED176V-Tg Mausmodell**

Malicdan et al. (2007) gelang es, ein Mausmodell (*GNE*<sup>-/-</sup>hGNED176V-Tg) zu generieren, das sowohl klinische, pathologische als auch biochemische Merkmale der DMRV/h-IBM2 repräsentierte. Hierzu bediente man sich zunächst des Knock-out Prinzips. Man klonete ein 17 kb

großes DNA Fragment der 129Sv/Ev Maus aus der Lambda Genbibliothek, das Exon 3,4 und 5 beinhaltete. Der Bereich von 1,4 kb aufwärts (5'), Exon 3 und 124 bp abwärts (3') wurden durch einen Inaktivierungsvektor ersetzt, der zusätzlich einen Neomycinmarker für die Positivkontrolle enthielt. Dieser Inaktivierungsvektor, bestehend aus der cDNA eines an DMRV erkrankten Patienten mit der D176V Mutation, wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) aus der RNA des Skelettmuskels gewonnen und anschließend mit einem Klonierungskit geklont. Die cDNA wurde sequenziert, das XhoI Fragment, das die cDNA Mutation enthielt, wurde herausgeschnitten und in den pCAGGS Vektor eingefügt. Die loxP Sequenzen dienten der Begrenzung des cDNA Stücks. Das den Inaktivierungsvektor enthaltende Fragment wurde gereinigt, in die C57BL/6 Oozyten einer Wildtyp Maus eingefügt und später in eine Ammenmaus transplantiert. Die Keimbahnübertragung konnte mittels PCR- und DNA-Analyse bestätigt werden. Durch diese Methode kreierte die Gruppe um Nichino ausschließlich Wildtyp und *GNE* heterozygote Mäuse (Malicdan et al., 2007).

Die transgene Maus h*GNED*176V wurde mit einer heterozygoten *GNE*<sup>+/-</sup> Maus gekreuzt, es entstand ein *GNE*<sup>+/-</sup> h*GNED*176V-Tg, nach erneuter Kreuzung mit *GNE*<sup>+/-</sup> wurde das finale, transgene Mausmodell *GNE*<sup>-/-</sup> h*GNED*176V-Tg generiert, das die menschliche Mutation D176V beherbergte. In neun Mäusen konnte die D176V Mutation mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) anhand isolierter DNA aus einer Schwanzprobe nachgewiesen werden, allerdings konnten nur vier Mauslinien Nachwuchs erzeugen. Die Expression des h*GNED*176V als auch die transgene Verteilung im Muskel und in verschiedensten Organen konnte mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Die höchste transgene Expression wurde im Skelettmuskel gemessen, gefolgt von Herz, Nieren, Gehirn, Milz und Leber (Malicdan et al., 2007).

Im Vergleich zum Wildtyp (WT) konnte beim *GNE*<sup>-/-</sup> h*GNED*176V-Tg generell eine deutliche Reduktion der Sialinsäure erfasst werden, am stärksten im Serum. Die *GNE*<sup>-/-</sup> h*GNED*176V-Tg unterschieden sich zum Zeitpunkt der Geburt phänotypisch nicht vom WT, im Alter von 30 Wochen stellten sich signifikante Unterschiede zum WT dar, besonders eindrücklich bei weiblichen Mäusen. Die Mäuse des *GNE*<sup>-/-</sup> h*GNED*176V-Tg Modells zeigten eine generell verminderte mittlere Überlebensrate, ein ab der 30. Woche signifikant vermindertes Gesamtgewicht, Muskelfaserveränderungen mit Variationen in Größe und Form, motorische Insuffizienzen, sowie erhöhte CK-Werte im Serum. Ab der 40. Woche wiesen Tiere mit defektem GNE Schlüsselenzym signifikante Muskelatrophien, insbesondere des M. gastrocnemius und M. quadriceps femoris auf. Ebenfalls nachweisbar waren histologische Muskelveränderungen wie beispielsweise RVs und Einschlusskörperchen. Die RVs konnten mit einer Häufigkeit von 41 % nachgewiesen werden, sie zeigten sich wie bei der h-IBM2 positiv auf Saure Phosphatase. Innerhalb der RVs sowie in unmittelbarer Nachbarschaft zu

Einschlusskörperchen waren ähnlich wie bei der h-IBM2 des Menschen demarkierte Areale sichtbar, die das A $\beta$ PP enthielten. Für die h-IBM2 typische Amyloidablagerungen konnten zwischen der 32.-34. Woche innerhalb der Muskelfasern, in Verbindung zu RVs, aber auch in Muskelfasern ohne RVs gefunden werden. Die lysosomalen Membranproteine LAMP-1, LAMP-2, und LC3 waren im Muskel des *GNE*<sup>-/-</sup> h*GNED176V*-Tg Mausmodells hochreguliert (Malicdan et al., 2007).

Es fanden sich gehäuft Strukturen in schnellen, aber auch in langsamen Muskelfasern in unmittelbarer Nachbarschaft zu RVs, die positiv mit Antikörpern gegen SM-31 reagierten. Auch Akkumulationen von sarkolemmalen Proteinen waren innerhalb der RVs im Muskel der *GNE*<sup>-/-</sup> h*GNED176V*-Tg Maus nachweisbar. Des Weiteren konnte elektronenmikroskopisch die Autophagenaktivität an zuvor lichtmikroskopisch sichtbaren RVs bestätigt werden (Malicdan et al., 2007).

Da Muskelfasern der transgenen Mäuse mit und ohne RVs stark auf Ubiquitin-Antikörper reagierten, war auch im Mausmodell von einer Beteiligung des Ubiquitin-Proteasomsystems auszugehen (Malicdan et al., 2007).

Bei einigen älteren Tieren wurden nekrotische Veränderungen oder Regenerierungsprozesse beobachtet, endomysiale oder perimysiale Entzündungszeichen, die für Myositiden sprächen, blieben jedoch in jeder Altersstufe aus (Malicdan et al., 2007).

Aufgrund von lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch nachweisbaren Charakteristika der h-IBM2 am *GNE*<sup>-/-</sup> h*GNED176V*-Tg Mausmodell, konnte ein Nachweis für den direkten Zusammenhang zwischen der *GNE* Mutation und den pathologischen, klinischen, sowie biochemischen Veränderungen erbracht werden (Malicdan et al., 2007).

#### **1.10.4 Das C57Bl/6 *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell**

Schwarzkopf et al. (2002) generierten mittels Gen-targeting nach dem Knock-out Prinzip das C57Bl/6 *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell, ein Modell mit mutiertem *GNE* Gen.

Das Material für den Klon, der den späteren Inaktivierungsvektor bzw. Zielvektor enthielt, wurde mittels Hybridisierung aus der genomischen Mausbibliothek 129Sv isoliert. Dieser genomische Klon beinhaltete den 5' Teil der UDP-GlcNAc 2-Epimerase. Mit Hilfe der verwendeten Hefe BamHI wurde der 5 kb Zielvektor, der das zweite Exon der UDP-GlcNAc 2-Epimerase mit der Codierungsregion 164-619 enthielt, entfernt (Schwarzkopf et al., 2002).

Unter der Kontrolle von Phosphoglycerat und pgk poly(A) addition site wurden Selektionsmarker eingesetzt. Ein Neomycin resistentes Gen plazierte man revers an das zweite Exon, ein Herpes simplex Thymidin Kinase Gen (TK-Gen) setzte man auf die NcoI Seite des 3.3 kb Fragments. Hierbei diente das Neomycinresistenzgen als positiv selektiver Marker, da

lediglich Zellen mit eingebauter Sequenz und somit Neomycinresistenz überleben können. Da die homologe Rekombination ein äußerst selten vorkommendes Ereignis darstellt, wurde ein Marker benötigt, der die stattgefundenene Rekombination anzeigt. Um Nebeneffekte auf den Phänotyp zu vermeiden, sollte die Selektionskassette wieder entfernt werden. Zur Kontrolle der stattgefundenenen Entfernung diente der Negativmarker, das TK-Gen. Jede Zelle, die das TK-Gen enthielt, konnte durch die Gabe von Ganciclovir vernichtet werden, somit überlebten lediglich die Zellen, bei denen die Selektionskassette entfernt wurde (Schwarzkopf et al., 2002).

Der Zielvektor konnte durch Linearisierung und Reinigung aufbereitet und 50 µg DNA in kultivierte Stammzellen eingesetzt werden. Die Entnahme der E14.1 Stammzellen erfolgte aus heterozygoten Blastozysten, die man an Tag 3.5 post coitum isolierte und im Anschluss vier weitere Tage kultivierte (Schwarzkopf et al., 2002).

Auf der Grundlage des Knock-out Prinzips konnten sowohl heterozygote *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse, als auch WT<sup>+/+</sup> Mäuse, jedoch keine homozygoten *GNE*<sup>-/-</sup> Mäuse gezüchtet werden. Mittels Genotypisierung der Embryonen stellte sich heraus, dass homozygote Defekte des *GNE* Gens zwischen Tag 8,5-9,5 letal verlaufen. Die *GNE*<sup>-/-</sup> Mutation ist demnach im Mausmodell mit dem Leben nicht vereinbar. Es konnte weder aktive UDP-GlcNAc 2-Epimerase, noch aktive mRNA der Epimerase in defizitären, homozygoten Stammzellen nachgewiesen werden (Schwarzkopf et al., 2002).

Heterozygote Tiere zeigten keine Auffälligkeiten, auch stellten sich unter dem Mikroskop im Vergleich zum WT keine pathologischen Merkmale in der Morphologie der Zelllinien dar. Heterozygote Stammzellen exprimierten im Schnitt um 50 % weniger mRNA und Proteine, auch die Enzymaktivität sank im Vergleich zum WT. Die Sialinsäure zeigte sich auf der Zelloberfläche von *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen vermindert. Enthielt das Nährmedium nur geringe Mengen sialisierter Glykoproteine, so verminderte sich die Konzentration der Sialinsäuren auf der Zelloberfläche heterozygoter Stammzellen um mehr als 75 %. Waren im Medium reichlich sialisierte Glykoproteine, reduzierte sich die Konzentration lediglich um 28 % verglichen mit dem WT. Auch NCAM wurde von heterozygoten Stammzellen vermindert, von homozygoten Zellen überhaupt nicht produziert (Schwarzkopf et al., 2002).

## 2 Zielstellung

Eine unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Horstkorte durchgeführte Laufraduntersuchung an *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen und C57BL/6 Kontrollmäusen zeigte eine reduzierte Leistungsfähigkeit der heterozygoten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (Hanisch et al., 2013). Dies war Anlass zu der Annahme, es könne sich bei der betroffenen *GNE*<sup>+/-</sup> Maus um ein Modell der h-IBM2 des Menschen handeln.

Mit dieser Arbeit galt es festzustellen, ob das von Schwarzkopf et al. (2002) generierte *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell prinzipiell in der Lage sein kann, als Modell für die h-IBM2 des Menschen zu fungieren. Hierfür waren folgende Fragestellungen erforderlich.

### 1. Sind Merkmale nachweisbar, die ebenfalls bei der h-IBM2 vorkommen?

Da viele neurogene aber auch myopathische Veränderungen mit einer Erhöhung der CK-Werte einhergehen, eignet sich diese gut als unspezifischer Marker für den Nachweis von Muskelschwächen. Auch bei der h-IBM2 zeigen sich die CK-Werte leicht erhöht (Malicdan und Nonaka, 2008).

Muskelfaserveränderungen wie dreieckig verformte, nekrotische oder aber regenerierende Muskelfasern (Askanas und Engel, 2003; Malicdan et al., 2007; Malicdan und Nonaka, 2008; Broccolini et al., 2011), eine Häufung von Typ-I-Muskelfasern (Malicdan und Nonaka, 2008) und der Nachweis von RVs sowie Einschlusskörperchen (Askanas, 2001; Askanas und Engel, 2003; Malicdan und Nonaka, 2008; Broccolini et al., 2009; Huizing und Krasnewich, 2009; Nakamori et al., 2013) werden derzeit bei der h-IBM2 auf die Mutation im *GNE* Gen zurückgeführt. Auch elektronenmikroskopische Veränderungen wie die pathologischen Ansammlungen diverser Proteine innerhalb der RVs sind in den Muskeln h-IBM2 erkrankter Patienten sichtbar (Kumamoto et al., 1994; Kumamoto, 1998; Malicdan und Nonaka, 2008; Hoshi et al., 2012; Llewellyn et al., 2013).

Wenn erhöhte CK-Werte und Muskelfaserschädigungen im *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell nachweisbar sind, dann könnte das Mausmodell als Modell für die h-IBM2 beim Menschen fungieren (*Muskelfaserhypothese*).

### 2. Sind die Merkmale bei betroffenen *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen stärker ausgeprägt als bei gesunden Mäusen?

Die h-IBM2 Betroffenen zeigen aufgrund der progressiven Muskelschwäche der unteren Extremität, insbesondere durch die frühe Beteiligung des M. tibialis anterior unter anderem Gangstörungen, sowie Schwierigkeiten beim Laufen (Nonaka et al., 1998; Malicdan und Nonaka, 2008; Huizing und Krasnewich, 2009). Histologisch und elektronenmikroskopisch lassen sich oben genannte Veränderungen darstellen.

Wenn eine signifikante Leistungsminderung und die für die h-IBM2 typischen histologischen und elektronenmikroskopischen Merkmale auch bei dem *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell nachgewiesen werden können, die sich in der verglichenen Kontrollgruppe nicht nachweisen lassen, dann könnte das *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell als Modell für die h-IBM2 beim Menschen fungieren (*Inzuchthypothese*).

### **3. Gibt es altersbedingte Unterschiede?**

Ursächlich für die h-IBM2 sind autosomal rezessiv vererbte Mutationen am *GNE* Gen (Jay et al., 2009).

Betroffene Patienten erkranken allerdings erst im frühen Erwachsenenalter, zwischen dem 15.-40. Lebensjahr (Sunohara et al., 1989; Nonaka, 1998). Somit sind auch histopathologische und elektronenmikroskopische Veränderungen erst im frühen bis mittleren Erwachsenenalter nachweisbar.

Wenn die *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse altersbedingte Unterschiede aufweisen, dann könnte das Mausmodell als Modell für die h-IBM2 beim Menschen fungieren (*Altershypothese*).

### **4. Kann die *GNE*<sup>+/-</sup> Maus als Modell für die h-IBM2 fungieren?**

Wenn sich *Muskelfaserhypothese*, *Inzuchthypothese* und *Altershypothese* bestätigen lassen, dann kann das *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell als Modell für die h-IBM2 angesehen werden.

### **3 Material und Methodik**

In diesem Kapitel werden die Versuchstiere, deren Haltebedingungen sowie der Versuchsaufbau beschrieben. Zusätzlich wird das verwendete Material aufgelistet. Im Anschluss werden die Methoden erklärt, die für die Fragestellung dieser Arbeit notwendig waren.

#### **3.1 Versuchstiere**

Da für diese Arbeit und die oben genannte Zielstellung Versuchstiere benötigt wurden, werden im Folgenden sowohl die Versuchstiere, deren Haltebedingungen, die erforderliche Tötung als auch das weitere Prozedere beschrieben.

##### **3.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen**

Für den Versuchsaufbau standen insgesamt 38 Mäuse beiderlei Geschlechts zur Verfügung, da bei alleiniger Verwendung weiblicher Tiere die Anzahl heterozygoter Mäuse zu gering erschien. Es handelte sich um 17 männliche und 21 weibliche Tiere des Inzuchtstammes C57BL/6. Die 19 heterozygoten Tiere mit der Mutation im *GNE* Gen (*GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse) wurden aus dem Tierstall des Instituts für Physiologische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bezogen. Die 19 Kontrolltiere des genetischen WT (C57BL/6 Mäuse) stammten aus dem Tierstall der Universitätsklinik Kröllwitz, Halle (Saale). Alle Tiere unterlagen einem Tag-Nacht Zyklus von jeweils zwölf Stunden, der Zugang zu Futter und Wasser war nicht limitiert. Die Würfe wurden geschlechterspezifisch getrennt und in separaten Käfigen untergebracht. Die Genotypisierung der *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse erfolgte anhand einer Schwanzprobe und wurde am Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Horstkorte durchgeführt. Um Verwechslungen zu vermeiden erhielten die Tiere eine entsprechende Markierung im Ohr. Alle Mäuse wurden anhand des Alters und des *GNE* Defekts in insgesamt vier Gruppen unterteilt, zwei C57BL/6 Kontrolltiergruppen im Alter von 24  $\pm$  2 Wochen sowie 80  $\pm$  2 Wochen und zwei *GNE*<sup>+/-</sup> Mausgruppen, ebenfalls im Alter von 24  $\pm$  2 Wochen und 80  $\pm$  2 Wochen.

Die vorausgegangenen Laufraduntersuchungen fanden unter Berücksichtigung des deutschen Tierschutzgesetzes statt, die Tötung der Tiere erfolgte unter fachgerechter und kompetenter Anleitung durch Herrn Prof. Dr. R. Horstkorte, Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

**Tabelle 1:** Darstellung der C57BL/6 Mäuse und *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse hinsichtlich der Gruppenverteilung, des Alters, der Anzahl und des Geschlechts.

Tiere	C57BL/6 Mäuse	<i>GNE</i> <sup>+/-</sup> Mäuse	C57BL/6 Mäuse	<i>GNE</i> <sup>+/-</sup> Mäuse
Alter (Wochen)	24	24	80	80
Anzahl der Tiere (n)	9	7	10	12
männlich : weiblich	3 : 6	5 : 2	4 : 6	4 : 7

### 3.1.2 Tötung der Tiere

Die Tötung der Tiere erfolgte mittels Nackendislokation unter vorheriger Anästhesie durch Äther mit Unterstützung und unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. Horstkorte vom Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

### 3.1.3 Erfassung des Gewichts einzeln/gesamt

Die Erfassung des Gewichts erfolgte unmittelbar nach der Tötung eines jeden Tieres. Hierbei wurden sowohl das Gesamtgewicht des jeweiligen Tieres, als auch die Einzelgewichte der *Mm. gastrocnemii*, *Mm. tibiales anteriores* und *Mm. quadriceps femoris* nach Präparation mit Hilfe einer Waage (Analytical Standard AS120, Ohaus) erfasst.

Die Messungen der Gesamtgewichte wurden an 24, die der Einzelgewichte an allen 38 Tieren durchgeführt.

### 3.1.4 CK-Bestimmung

Die Messung der CK erfolgte mittels Blutentnahme aus dem Herzen.

Unmittelbar nach Tötung eines jeden Tieres konnte mit Hilfe einer Schere und eines Skalpells die Bauchdecke geöffnet werden, über eine 1,2 ml Monovette der Firma Sarstedt erfolgte dann die Entnahme einer Blutprobe direkt aus dem Ventrikel des Herzens. Nach der Präparation wurden die beschrifteten Proben bei Raumtemperatur ins Zentrallabor der Universitätsklinik Halle (Saale) gebracht, wo man die Bestimmung der CK (Laborautomat DXC, Firma Beckmann) vornahm.

Um einen Vergleich zwischen C57BL/6 Mäusen und *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen schaffen zu können, wurden die CK-Bestimmungen an allen 38 Tieren vorgenommen.

### **3.1.5 Präparatentnahme**

Nach Eröffnung der Bauchdecke wurden die Mm. tibialis anteriores, Mm. quadriceps femoris und Mm. gastrocnemii an jeweils beiden Hintergliedmaßen von der Faszie befreit und am Sehnenansatz durchtrennt.

### **3.1.6 Auswahl der Muskelproben**

Die Mm. quadriceps femoris und gastrocnemius wurden ausgewählt, weil sie zum einen bei dem *GNE* -/- *GNE* D176V-Tg Maus-Modell starken pathologischen Veränderungen unterlagen (Malicdan et al., 2007), zum anderen ist der M quadriceps femoris bei der h-IBM2 häufig ausgespart bzw. nur sehr leicht betroffen. Der M. tibialis anterior wurde ebenfalls untersucht, da er bei der h-IBM2 oftmals sehr früh und sehr stark betroffen ist.

Alle drei genannten Muskeln sind Mischmuskeln, die sowohl Typ-I-Muskelfasern als auch Typ-II-Muskelfasern enthalten. Sie waren zudem gut zugänglich und komplikationslos präparierbar.

### **3.1.7 Konservierung und Aufbereitung der Präparate**

Nach Präparatentnahme wurden die Muskeln für histopathologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen als auch zur Bestimmung des Sialinsäuregehalts verschiedenartig aufbereitet.

Beurteilt wurden die Muskeln hauptsächlich nach histologischen Gesichtspunkten, die auch für die Diagnostik der h-IBM2 beim Menschen herangezogen werden (Hilton-Jones et al., 2010). Anhand der jeweils drei entnommenen Muskeln wurde nach Anzeichen der Muskelfaserschädigung gesucht. Lichtmikroskopisch wurde die Häufigkeit von RVs und binnenständigen Kernen bestimmt und Muskelfaserdurchmesser sowie die Anzahl der verschiedenen Muskelfasertypen gezählt. Zusätzlich wurden Veränderungen in Hinblick auf das zunehmende Alter ausgewertet. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen dienten hauptsächlich der Suche nach RVs sowie pathologischen Ansammlungen von Proteinen.

Die Muskelproben zur Bestimmung des Sialingehalts wurden in ein mit  $-196^{\circ}$  C gefülltes Gefäß mit flüssigem Stickstoff getaucht, im Anschluss einzeln in 5 ml grosse, beschriftete Plastikbehälter (Sample Vial LDPE; NALGENE) verpackt und dem Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zugeführt.

Die Proben für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden gestreckt auf einer Pappe für 24 h in einer 6 % igen Glutardialdehydlösung fixiert und anschließend in einen Phosphatpuffer überführt und bei  $4^{\circ}$  C gelagert.

Zur histopathologischen Aufbereitung musste der entnommene Muskel einzeln mit Hilfe eines speziellen Einbettmediums (Tissue Freezing Medium; Fa. JUNG) auf 20 mm großen

Korkplättchen (Durchmesser: 20 mm, Stärke: 2 mm, VWR: 01/1452106) fixiert werden. Unter Zuhilfenahme einer langen Pinzette (Typ 0951.1; ROTH) wurde das Präparat zunächst einige Sekunden in ein mit  $-80^{\circ}\text{C}$  Isopenthanlösung gefülltes Gefäß getaucht, anschließend in ein  $-196^{\circ}\text{C}$  vorgekühltes Gefäß (Dewargefäß 2L, Typ GSS, VWR: GSS 2000; Zeiss) mit flüssigem Stickstoff gegeben, bis das transparente Einbettmedium eine weißliche Farbe annahm und somit die Gefrierung gewährleistet war. Die vorhergehende Behandlung mit Isopenthan macht das Verfahren schonender und weniger anfällig für Gefrierartefakte. Im Anschluss konnte jeder Muskel einzeln in 5 ml grosse, beschriftete Plastikbehälter (Sample Vial LDPE; NALGENE) verpackt und in flüssigem Stickstoff bei konstanten  $-196^{\circ}\text{C}$  im Stickstoffbehälter (Arpege 140; AIRLIQUIDE) des Muskellabors der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) zur Zwischenlagerung aufbewahrt werden.

Die in Stickstoff gelagerten Muskeln wurden für die histologischen Färbungen am Mikrotom (Typ CM3050 S; LEICA) geschnitten und im Muskellabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) nach den aktuellen Protokollen gefärbt. Hierzu mussten die einzelnen Muskeln nach Entnahme aus dem Gefrierschrank 10-15 min im Mikrotom (Typ CM 3050 S; LEICA) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern, damit bestmögliche Schnittergebnisse erzielt werden konnten. Für die verschiedenen Färbemethoden musste jeder Muskel in  $5\ \mu\text{m}$  und  $10\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte geschnitten und auf verschiedene, beschriftete Objektträger gebracht werden. Für die HE-Färbung, die myofibrilläre ATPase (ATP), Kongorot und Gomori-Trichrom mussten die Schnitte auf Objektträger (M7620, Mattrand bds.,  $76\times 26\times 1,1\ \text{mm}$ ; SÜSSE), für die Cytochrom C Oxidase/Succinat-Dehydrogenase Färbung (COX/SDH) auf Poly-L-Lysin beschichtete Gläser ( $25\times 75\times 1\ \text{mm}$ ; MENZEL) gebracht werden. Alle Schnitte wurden 30 min getrocknet, die für die COX/SDH Färbung vorgesehenen Schnitte konnten danach einzeln in Aluminiumfolie verpackt und im Gefrierschrank unter konstanten  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden. Alle anderen Schnitte verblieben unter Raumtemperatur für weitere drei Tage im Labor und wurden anschließend verpackt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

## 3.2 Material

Im Folgenden sind sowohl die verwendeten Chemikalien als auch alle genutzten Geräte aufgelistet.

### 3.2.1 Chemikalien

Nachfolgend werden zunächst alle verwendeten Chemikalien aufgeführt:

**BD BIOSCIENCES, Heidelberg; Deutschland:** Caveolin

**DAKO Cytomation Denmark, A/S, Glostrup:** LSAB\*KitS, Universal, Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan, AppliChem Peroxidase-Block

**FLUKA Chemie AG, Seelze; Deutschland:** Chromotrop 2 R

**JUNG GmbH, Nussloch; Deutschland:** Einbettmedium Jung Tissue Freezing Medium

**MERCK GmbH, Darmstadt; Deutschland:** ATP (Adenosin-5'-triphosphat), Calciumchlorid-Dihydrat, Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat, 5,5 Diethylbarbitursäure-Natriumsalz, Eosin G (C.I. 45380), Essigsäure 100 %, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % ig, KAISERS Glyceringelatine, Kongorot (C.I. 22 120), Leukognost SP, MAYERS Hämalaun, Natriumacetat-Trihydrat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (MG: 137,99), Natriumchlorid, Wolframatophosphorsäure-Hydrat

**ROCHE Diagnostics GmbH, Mannheim; Deutschland:** Dinatriumsalz, Leukognost SP (10127523001)

**ROTH, Karlsruhe; Deutschland:** Einschlussmedium Rothi Histokitt II, 12 %  
Natriumhypochloridlösung-technisch, Saccharose

**SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg; Deutschland:** Catalase, Fast Green FCF reinst, Nitroblue Tetrazolium (NBT), Phenazine methosulphate (PMS)

**SIGMA Chemie GmbH, Deisenhofen; Deutschland:** Ammoniumsulfidlösung 20 %, Cytochrom-C, 3,3 Diaminobenzidine-Tabletts, Ethanol 96 %, Ethanol abs., KOH-Lösung (1 N, 14,2 g/250 ml Aquadest), Natrium Azide, Natrium succinat (disodiumsalt) 6H<sub>2</sub>O

**THERMO-SHANDON GmbH, Frankfurt; Deutschland:** Gill 3 Hämatoxilin

### 3.2.2 Geräte

Nachfolgend werden alle verwendeten Geräte aufgeführt:

**AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf; Deutschland:** Stickstofftank, Modell Arpege 140

**BECKMANN Coulter GmbH, Krefeld; Deutschland:** Laborautomat DXC 800

**Carl ZEISS AG; Deutschland:** Dewargefäß 2 l (Typ GSS 2000) VWR  
Digitalkamera/Mikroskop AxioCam HRc, Lichtmikroskop Axioplan, Programm Axio Vision 3.1

**EPPENDORF Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg; Deutschland:** Pipette, Reference (10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl, 5000 µl)

**FEATHER pfm medical ag, Köln; Deutschland:** Mikrotom Klingen, carbon steel C35

**FUJITSU, SIEMENS; Deutschland:** PC Windows 2000

**HERAEUS Holding GmbH, Hanau; Deutschland:** Brutschrank T6 Function Line

**LEICA Microsysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar; Deutschland:** Mikrotom CM 3050 S

**LIEBHERR-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss; Deutschland:** Kühlschranks Premium NoFrost (-20° C)

**Paul MARIENFELD GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen; Deutschland:** Deckglas  
Laboratory Glassware (Ref.nr 0101172, 24x32 mm)

**MENZEL GmbH + Co. KG, Braunschweig; Deutschland:** Objektträger polylysinbeschichtet (Thermo Scientific) (25x75x1 mm)

**OHAUS Waagen Vertriebsgesellschaft, Gießen; Deutschland:** Waage Analytical Standard AS120, geeicht bis 2011

**ROTH, Karlsruhe; Deutschland:** Pinzette (0951.1), Stoppuhr

**SANYO Electric Co., Ltd. Biomedical Division; Japan:** Kühlschrank Sanyo Ultra Low (-81° C), Modell MDF-U4086S

**SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht; Deutschland:** Monovette 1,2 ml

**SCIENTIFIC INDUSTRIES, Inc.; USA:** Vortex Genie 2

**SÜSSE LABORTECHNIK, Gudensberg; Deutschland:** Objektträger Nr. M7620 (76x26x1,1 mm)

**VWR International GmbH, Darmstadt; Deutschland:** Korkplättchen (01/1452106)

großer Joghurtbecher (Gefäß, das man mit -80° C Isopenthanlösung füllt)

### **3.3 Methodik**

Der experimentelle Teil der Arbeit fand im Muskellabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) statt. Die durchgeführten Untersuchungen werden in diesem Abschnitt aufgelistet und erklärt.

#### **3.3.1 Bestimmung der Muskelfasertypen: COX/SDH**

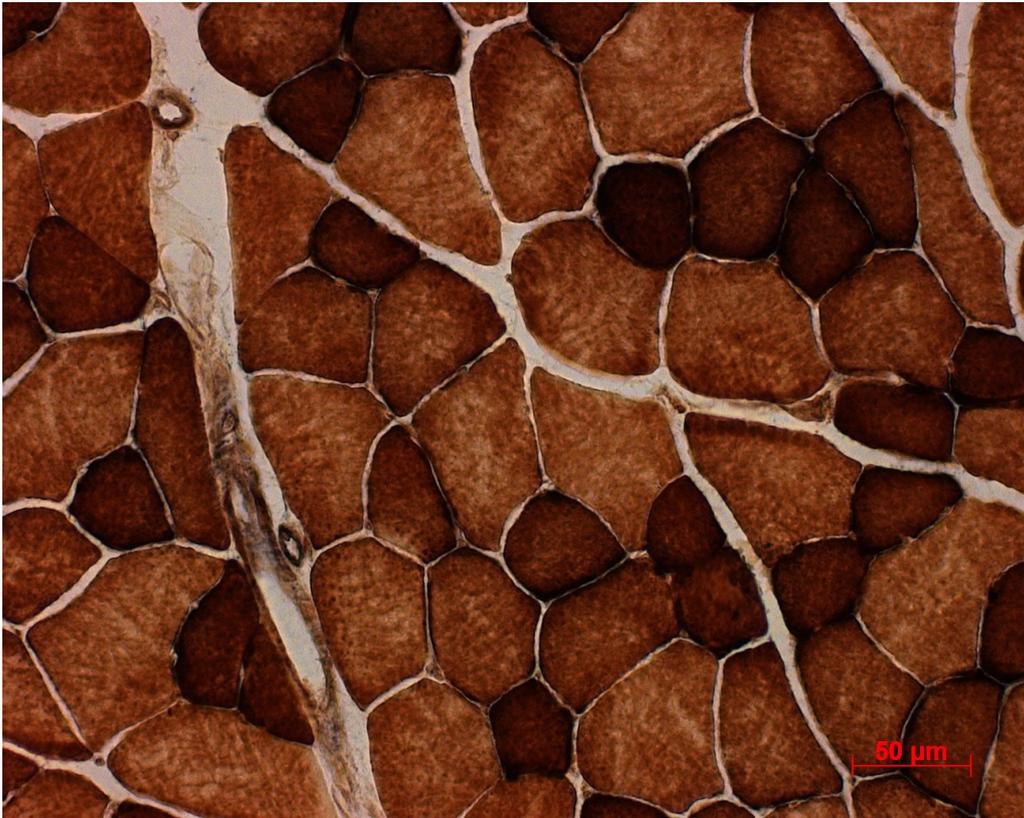
Sowohl die COX als auch die SDH sind Komponenten der Atmungskette. Die COX stellt den Komplex IV dar, befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und oxidiert Cytochrom C zu Ferricytochrom C. Sie ist ein Parameter für die oxidative Tätigkeit in Zellen und kann mittels COX Reaktion anhand brauner bis schwarzer Färbung nachgewiesen werden (Romeis, 2008).

Die SDH ist ein Flavoprotein und bildet den Komplex II der Atmungskette, sie katalysiert die reversible Oxidation von Bernsteinsäure zu Fumarat. Das Reaktionsprodukt ist dunkelblau (Romeis, 2008).

Beide Reaktionen geben Aufschluss über die Mitochondrienanzahl innerhalb einer Fasern und somit auch über das Faserverteilungsmuster innerhalb des Skelettmuskels. Mitochondrienreiche Fasern lassen sich intensiver anfärben als mitochondrienarme Fasern (Dubowitz und Sewry, 2007; Bergmann et al., 2009).

Der gesunde Skelettmuskel weist mit der COX Färbung eine regelmäßige, myofibrilläre Binnenstruktur auf und stellt sich schachbrettartig dar. Mitochondrienreiche Typ-I-Muskelfasern werden dunkelbraun, Typ-II-Fasern hellbraun angefärbt (Abb. 2). Mitochondrien selbst lassen sich als kräftig braune Strukturen darstellen. Treten mitochondriale Defekte auf, so erweisen sich die Fasern als COX-negativ und können lediglich über die SDH angefärbt

werden. Daher imponieren die Zellen dann je nach Mitochondrienanzahl durch eine hell- bis dunkelblaue Verfärbung (Dubowitz und Sewry, 2007; Bergmann et al., 2009).



**Abb. 2:** COX/SDH Färbung. *M. quadriceps femoris* einer sechs Monate alten, männlichen GNE+/- Maus; dunkle, mitochondrienreiche Typ-I-Fasern, helle Typ-II-Fasern.

### Färbeprotokoll

Die 10 µm Schnitte (Poly-L-Lysin beschichtet) bis kurz vor der Färbung im -80° C Gefrierschrank lagern, vor der Färbung ca. 5 min auf Zimmertemperatur bringen

1. Schnitte mit Diamantschneider umkreisen
2. 50 µl Inkubationsmedium bei Zimmertemperatur einige Minuten auftauen lassen, vortexen und mit einer Pipette auf die Schnitte geben, diese anschließend in eine mit Aquadest befeuchtetem Filterpapier ausgelegte Petrischale legen und 60 min bei 37° C inkubieren
3. Spülen mittels Spritzflasche mit 0,05 M Natrium Phosphatpuffer pH 7,4
4. Objektträger vorsichtig um Schnitt herum abtrocknen und 50 µl SDH-Lösung auf die Schnitte geben und 60 min bei 37° C in feuchter Kammer inkubieren
5. Spülen in Aquadest und schwenken in aufsteigender Alkoholreihe (70 % kurz, 96 % für 30 s, zweimal abs. Alkohol min. 2 min)
6. Anschließend einbetten mit Roti Histokitt II (Firma Roth)

#### Zusammensetzung SDH-Lösung (kurz vorher herstellen):

- Natrium-Succinat 100 µl 130 mM
- PMS 100 µl 2 mM
- Natrium-Azid 10 µl 100 mM
- NBT 800 µl 1,875 mM

#### Herstellung der Inkubationslösung

- DAB 10 mg
- Phosphatpuffer pH 7,4 9ml 0,05M
- Saccharose  
(auf Magnetrührer gründlich mischen) 750 mg
- Katalase 1 : 1000 2 ml  
(5 µl Stammlösung + 5 ml Aquabidest)
- Cytochrom C 20 mg
- Anschließend in Eppendorfcups portionieren (je 120 µl) und bei -80° C einfrieren

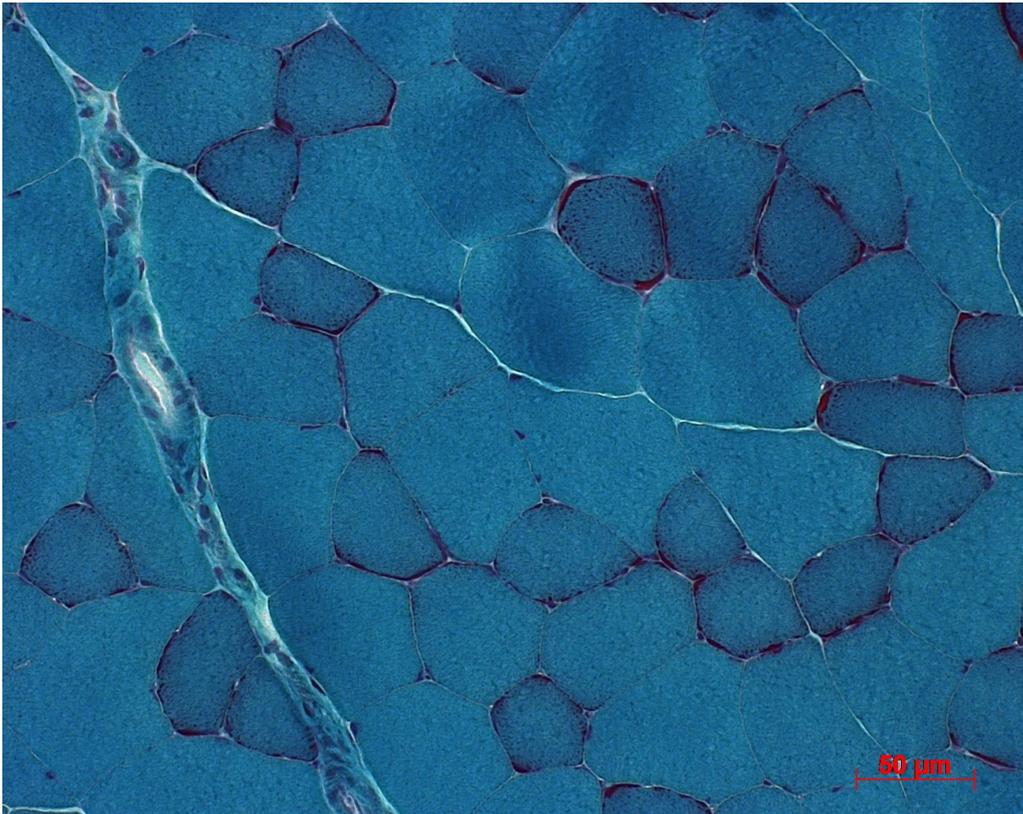
#### Zusammensetzung 0,05 Phosphatpuffer pH 7,4

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (MG: 137,99) 6,9 g in 1000 ml Aquadest pH 7,4 einstellen

### **3.3.2 Nachweis von RVs: Gomori-Trichrom Färbung (modifiziert)**

Die Gomori-Trichrom Färbung zeigt ein grün bis bläuliches Färbergebnis und wird von Askanas et al. (1998) für die Diagnostik der h-IBM2 empfohlen, da hiermit sowohl der Nachweis von RVs als auch das Fehlen von entzündlichen Infiltraten als wichtige Differentialdiagnose zur s-IBM erbracht werden kann. Typ-I-Fasern imponieren als kräftig blaugüne Zellen, Typ-II-Fasern lassen sich schwach blaugrün darstellen (Abb. 3).

Gegebenenfalls können fuchsinophile Ränder oder punktförmige Areale innerhalb des Zytoplasmas sichtbar sein. Mitochondrien, Zellkerne und das Myelin von nervalen Strukturen stellen sich als rot bis auberginefarbende Strukturen dar, Kollagen imponiert hellgrün (Dubowitz und Sewry, 2007). Die RVs werden als optisch leere bis rot geränderte Strukturen sichtbar, Nekrosen lassen sich blaßgrün darstellen (Dubowitz und Sewry, 2007; Bergmann et al., 2009).



**Abb. 3:** Gomori-Trichrom Färbung (modifiziert). *M. quadriceps femoris* einer sechs Monate alten, männlichen GNE<sup>+/-</sup> Maus; dunkle Typ-I-Fasern, helle Typ-II-Fasern.

### Färbeprotokoll

Im Mikrotom gelagerte 5 µm Schnitte ca. 5 min vor der Färbung auf Zimmertemperatur bringen

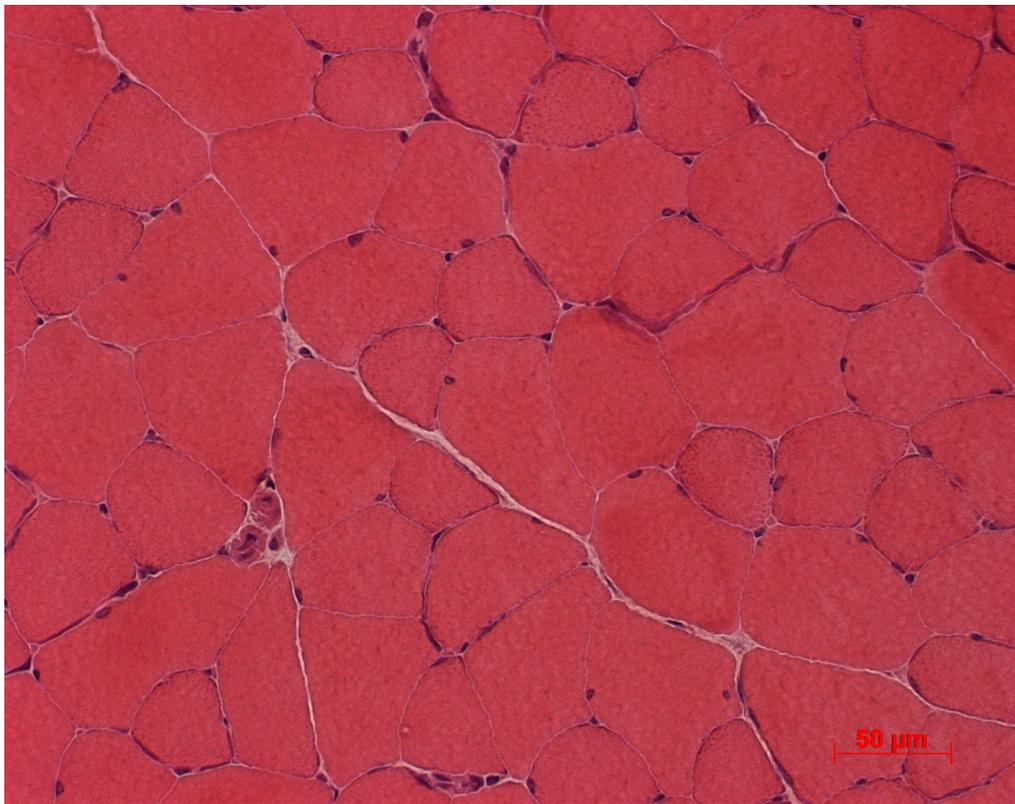
1. Schnitte ca. 5 min in vorher filtrierte Hämatoxilin SHANDON<sup>°</sup> Lösung (nach Gill) geben
2. Schnitte gut spülen, dann ca. 10 min bläuen in Leitungswasser
3. 20 min in vorher filtrierter Gomori-Lösung belassen
4. Für 5 min in 0,2 % ige Essigsäure (1 ml in 500 ml Aquadest) geben
5. In Aquadest spülen, kurz in 96 % igem Alkohol belassen, dann je 2 min in absteigender Alkoholreihe belassen
6. Unter dem Abzug zweimal kurz schwenken in Xylol
7. Eindecken mit Roti Histokitt II (Firma Roth)

### Zusammensetzung Gomori-Lösung (ca. sechs Monate haltbar)

- |                               |        |
|-------------------------------|--------|
| - Chromotrop 2 R              | 1,2 g  |
| - Aquadest                    | 200 ml |
| - Fast Green FCF              | 0,6 g  |
| - Wolframatophosphorsäure     | 1,2 g  |
| - Eisessig (Essigsäure 100 %) | 2,0 ml |

### 3.3.3 Nachweis von binnenständigen Kernen: HE-Färbung

Die HE-Färbung zählt zu den Routinefärbungen in der Pathologie. Hämatoxilin, eine aus Blauholz gewonnene Sustanz, entwickelt sich mittels Oxidation zu Hämatein und durch Zugabe von Alaun zu Hämalaun (Romeis, 2008). Sowohl Hämatein als auch Hämalaun stellen basische Farbstoffe dar und reagieren daher mit sauren Substanzen. Eosin hingegen ist ein saurer Farbstoff und reagiert mit basischen Bestandteilen. Somit lassen sich saure Moleküle wie beispielsweise Nukleinsäuren der Kerne, das raue endoplasmatische Retikulum (rER), Schleimsubstanzen oder auch Bakterien blau darstellen, Strukturen wie Zytoplasma oder Interzellularsubstanzen erscheinen mittels Eosin rot (Abb. 4). Typ-I-Muskelfasern wirken kräftig rot, Typ-II-Fasern weniger kräftig rot, Bindegewebe läßt sich blaß rosa darstellen (Dubowitz und Sewry, 2007). Diese Färbemethode wurde durchgeführt, um binnenständige Kerne nachweisen zu können (Abb. 12).



**Abb. 4:** HE-Färbung. *M. quadriceps femoris* einer sechs Monate alten, männlichen GNE<sup>+/-</sup> Maus.

#### Färbeprotokoll

Zu Beginn der Färbung wurden die unfixierten 5 µm dicken Kryostatschnitte in spezielle Färbeständer sortiert und durch in Glasküvetten gefüllte Lösungen geführt.

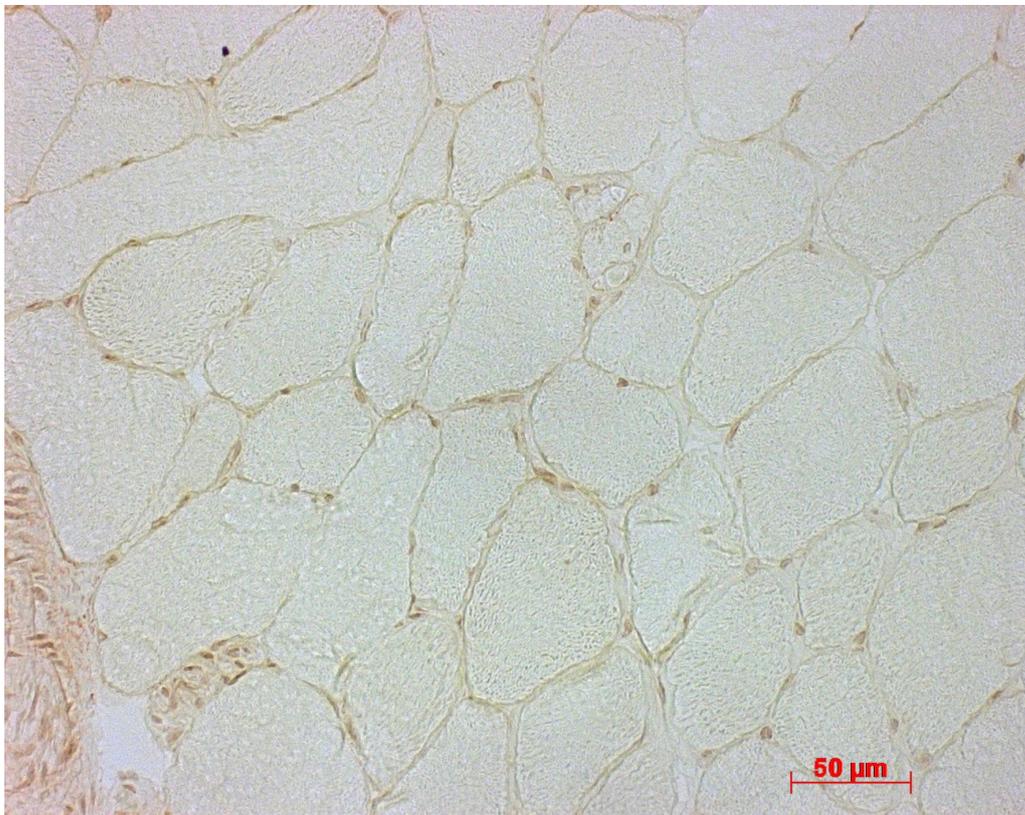
(5 µm dicke Schnitte frisch oder ein bis drei Tage getrocknet)

1. Schnitte für 10 min in zuvor filtrierte Hämalaun-Lösung geben

2. Spülen in Leitungswasser
3. 10 min bläuen in frischem Leitungswasser
4. Schnitte für 1 min in 1 % ige Eosin-Lösung (1 g/100 ml Aquadest und ein bis zwei Eisessigtropfen) geben
5. Kurz spülen in Leitungswasser
6. Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe schwenken (70 % kurz, 96 % für 30 s, zweimal abs. Alkohol min. 2 min)
7. Unter dem Abzug zweimal kurz schwenken in Xylol
8. Anschließend einbetten mit Roti Histokitt II (Firma Roth)

### 3.3.4 Nachweis von Amyloid: Kongorot-Färbung mit Kongorotkit nach Highman

Das Kongorot gehört zu den Azofarbstoffen und schlägt bei pH 3-5,2 von blauviolett nach rotorange um. Aufgrund der Bindung des kolloidalen Farbstoffs an Amyloidfibrillen ist es möglich, Amyloid anzufärben, das im Durchlicht rosa bis rot erscheint (Abb. 5) und unter polarisiertem Licht wegen der gerichteten Anlagerung eine apfelgrüne Doppelbrechung aufweist (Romeis, 2008). Im Fluoreszenzmikroskop erscheint Amyloid im Rhodaminfilter rot und wird insbesondere zur Differenzierung zwischen h-IBM2 und s-IBM empfohlen (Askanas, 1998), da Amyloid in h-IBM2 meist nicht nachweisbar ist.



**Abb. 5:** Kongorot-Färbung mit Kongorotkit nach Highman. *M. tibialis anterior* einer 18 Monate alten, weiblichen GNE<sup>+/-</sup> Maus.

## **Färbeprotokoll**

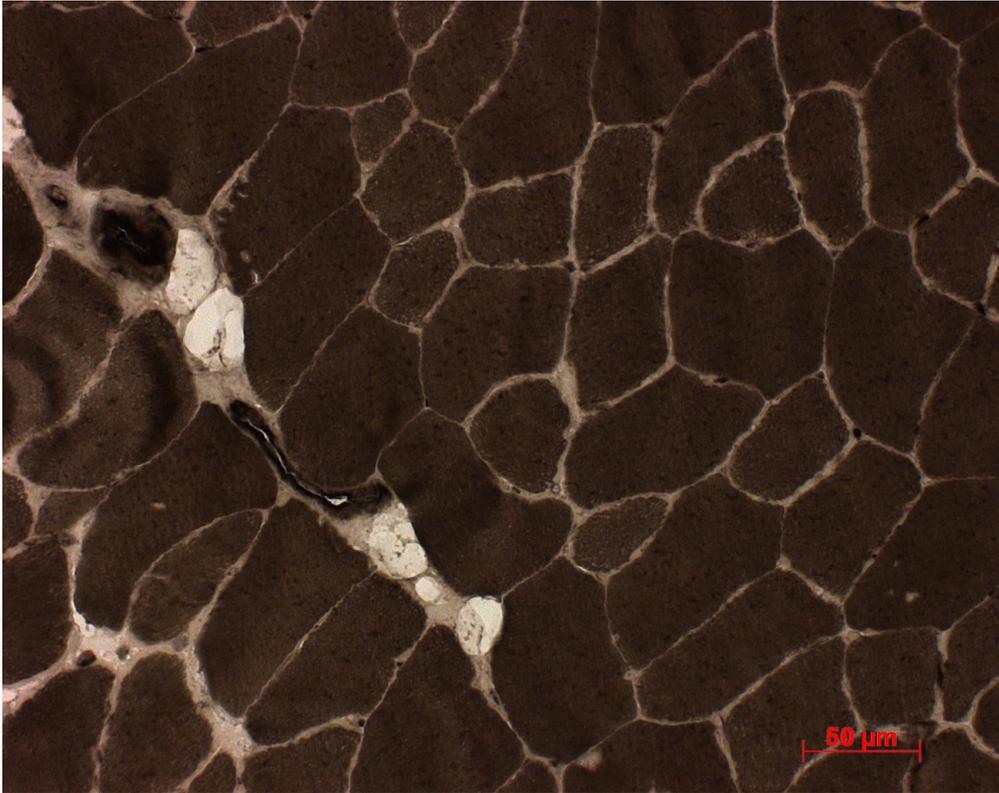
(Zur Färbung 5 µm Schnitte verwenden)

1. Schnitte in typischer Weise entparaffinieren und rehydratisieren
2. 1 min spülen in Aquadest
3. 5 min färben in Hämatoxylin-Lösung nach Gill III oder Gill II
4. 5 min unter kaltem Leitungswasser spülen
5. 10 min unter dem Abzug färben in Kongorot-Lösung
6. Kurz spülen in Aquadest
7. 30-40 s in KOH Lösung differenzieren
8. 30 s spülen in EtOH 96 %
9. Ein weiteres Mal 30 s spülen in EtOH 96 %
10. 1 min entwässern in EtOH 100 %
11. Erneut 1 min entwässern in EtOH 100 %
12. 5 min klären in Xylol
13. Erneut 5 min klären in Xylol (Neo-Clear)
14. Eindecken mit Rothi Histokitt (Firma Roth)

### **3.3.5 Myofibrilläre ATPase-Reaktion bei pH 9,4**

Die myofibrilläre ATPase ist ein Enzym, das mittels Spaltung von ATP in ADP und Phosphat Energie freisetzt und somit die Kontraktion der Myofibrillen gewährleistet (Rappas et al., 2004).

Die myofibrilläre ATPase Reaktion macht das bei der Umwandlung entstehende Phosphat sichtbar und gilt als wichtigste und konstanteste histochemische Unterscheidungsmethode der Muskelfasertypen (Boellaard, 1995). Bei der hier verwandten Präinkubation von pH 9,4 (Abb. 6) weisen Typ-I-Fasern des Skelettmuskels beim Menschen eine helle, Typ-II-Fasern im allgemeinen eine dunkelbraun bis schwarze Färbung und Typ-IIa im Besonderen eine braune Färbung auf. Im Mausmuskel zeigte sich die Differenzierung der Muskelfasertypen jedoch nicht eindeutig, so dass die Färbung nicht zur Auswertung hinzugezogen wurde.



**Abb. 6:** Myofibrilläre ATPase-Reaktion bei pH 9,4. *M. tibialis anterior* einer 18 Monate alten, weiblichen GNE<sup>+/-</sup> Maus.

### Färbeprotokoll

Für diese Färbung sollten die Objektträger mindestens einen Tag zuvor aus dem Gefrierschrank zum Trocknen entnommen und alle Lösungen auf Zimmertemperatur gebracht werden.

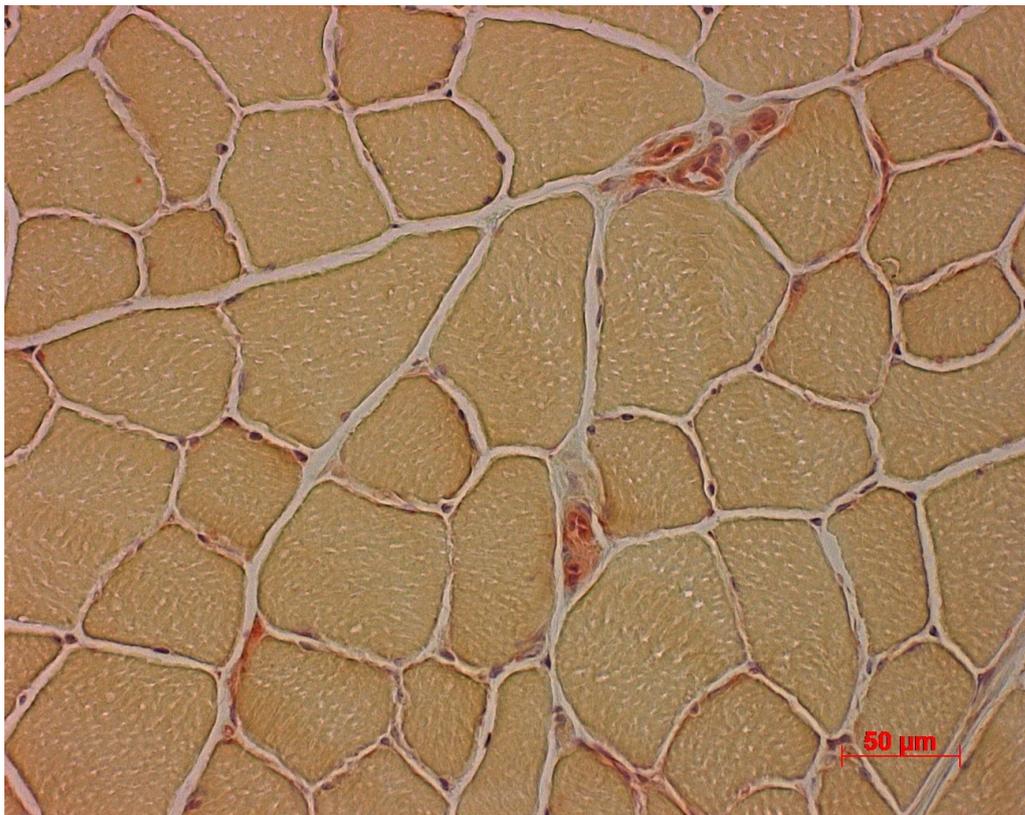
1. ATPase Inkubationslösung herstellen und bei 37° C 1 h vorwärmen
2. 5 μm Schnitte in ATPase pH 9,4 geben und 15 min inkubieren
3. Jeweils dreimal 1 min in Calciumchlorid geben
4. 5 min in Cobalt (II)-chlorid (10 g Cobalt (II)-chlorid/500 ml Aquadest) belassen
5. Viermal spülen in 0,01 ml Natrium-Barbital-Lösung (0,1 M Natrium-Barbital-Lösung 1 : 10 verdünnen mit Aquadest
6. 50-60 s spülen in Leitungswasser
7. 20 s in Amoniumsulfid (5 ml 20 % iges Amoniumsulfid in 95 ml Aquadest) belassen
8. Waschen und einstellen in Aquadest
9. Eindecken mit Kaisers Glyceringelatine

#### Zusammensetzung ATP-Inkubationslösung

- |                           |                 |
|---------------------------|-----------------|
| - Natrium-Barbital-Lösung | 18 ml 0,1 M     |
| - Calciumchlorid          | 9,0 ml 0,18 M   |
| - ATP                     | 0,1474 g 2,9 mM |
| - Aquabidest              | 57 ml           |

### **3.3.6 Nachweis Saure Phosphatase-positiver Strukturen: Saure Phosphatase Reaktion**

Saure Phosphatasen kommen in Lysosomen aber auch im ER vor und sind vor allem an Apoptosevorgängen beteiligt. Sie haben ein pH-Optimum von 4,5-5,5 und spalten Ester der Orthophosphorsäure mit verschiedenen Alkoholen und Phenolen. Mittels Enzymhistochemie können Saure Phosphatasen in einen rot bis rotbraunen Farbstoff umgesetzt und somit nachgewiesen werden (Abb. 7). Sie stellen einen guten Marker für Lysosomen dar. Bei lysosomalen Speicherkrankheiten und vakuolären Myopathien kommen vermehrt Saure Phosphatase positive Strukturen vor. Gleichermäßen ist das Alterspigment Lipofuszin als Restlysosom positiv für Saure Phosphatase (Romeis, 2008; Bergmann et al., 2009).



**Abb. 7:** Saure Phosphatase Reaktion. *M. quadriceps femoris* einer 18 Monate alten, weiblichen GNE<sup>+/-</sup> Maus.

## **Färbeprotokoll**

Für diese Färbung sollten 10 µm Schnitte und Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger verwendet werden. Nach dem Schneiden werden die Schnitte ein bis drei Tage luftgetrocknet.

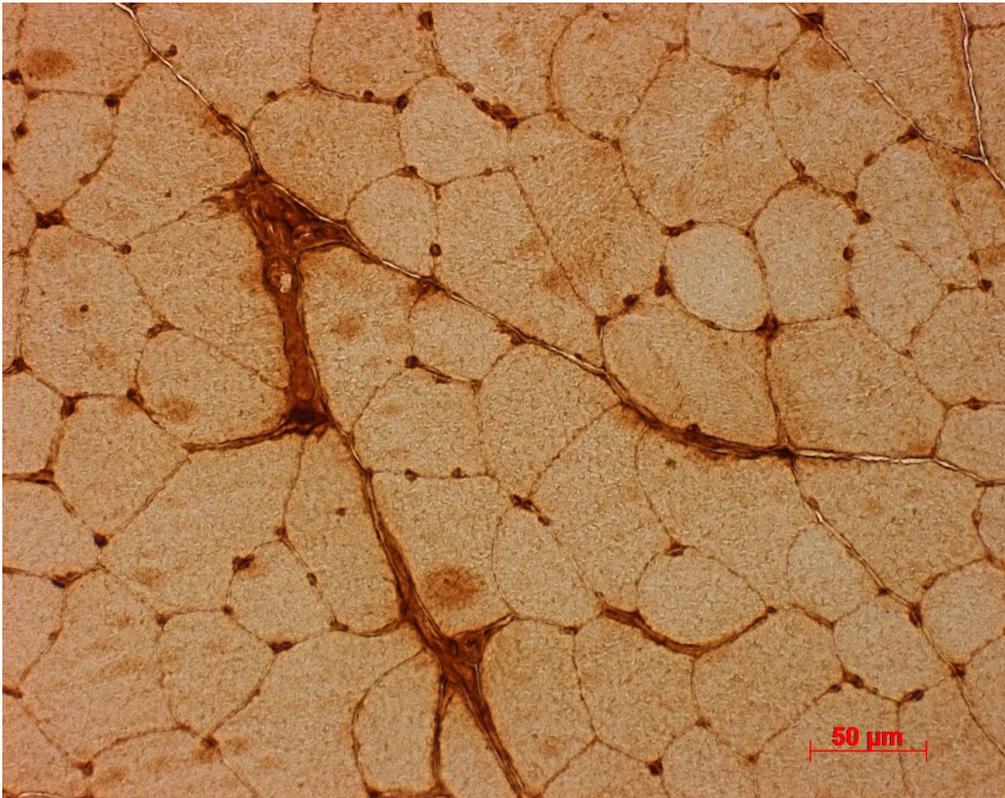
1. In einem Becherglas aus Kit (KS) 670 µl von Reagenz 1 und einen gestrichenen Messlöffel von Reagenz 2 in 20 ml Aquadest lösen
2. Zwei Tropfen Reagenz 3 und zwei Tropfen Reagenz 4 in einem Eppendorfcup mischen und nach 1 min mittels Pipette ins Becherglas geben
3. Den Ansatz mischen und in einer Glasküvette filtrieren
4. Bei 37° C für 2 h in der Färbelösung färben
5. Spülen in Aquadest
6. Hämalun 1 : 4 verdünnt auf die Schnitte geben und sofort wieder abgießen
7. Bläuen in Leitungswasser für 1 min
8. Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe schwenken (70 % kurz, 96 % für 30 s, zweimal abs. Alkohol min. 2 min)
10. Zweimal klären in Xylol (Neo-Clear)
11. Einbetten in Roti Histokitt II (Firma Roth)

### Zusammensetzung Kit

- **Reagenz 1**
- Naphthol AS-OL Phosphorsäure      1.155 mmol
- N,N Dimethylformamid              365 mmol
- **Reagenz 2**
- Natriumacetat                          152 mmol
- **Reagenz 3**
- Pararosanilin                          1.235 mmol
- Hcl                                        20 mmol
- **Reagenz 4**
- Nitritlösung                            5.8 mmol

### **3.3.7 Caveolin 3 Reaktion als Membranmarker**

Die Caveoline sind membranständige Proteine, die sich in den Caveolae, den Einbuchtungen der Plasmamembran befinden. Es sind drei verschiedene Caveoline bekannt, von denen Caveolin 3 nur in den Muskelzellen vorkommt. Der Membranmarker ist essentiell für die Muskelentwicklung und -funktion. Ein Defizit führt unter anderem zu distalen Myopathien. Es wurde eingesetzt, um das Sarkolemm zu kennzeichnen beziehungsweise zu markieren (Abb. 8) (Ockleford et al., 2002; Knop, 2006).



**Abb. 8:** Caveolin 3 Reaktion. *M. quadriceps femoris* einer sechs Monate alten, männlichen GNE+/- Maus.

### Färbeprotokoll

Für diese Färbung sollten 5 µm Schnitte und Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger verwendet werden. Diese auf Zimmertemperatur bringen und mit einem Diamantschreiber umkreisen und beschriften. Zu jedem Antikörpernachweis sollte eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle erfolgen (Orthomuskel, Aceton-fixiert).

1. Objektträger in eine feuchte Kammer geben, pro Schnitt 50 µl Primär-Antikörper auftragen und 60 min bei Raumtemperatur inkubieren
2. Objektträger mit Tris-Puffer spülen und dreimal jeweils 10 min in Tris-Puffer einstellen
3. Objektträger um den Schnitt vorsichtig trocknen und je 50 µl Sekundär-Antikörper auftragen, 1 : 100 verdünnt (Peroxidase-conjugated goat anti-mouse Ig) und 60 min bei Raumtemperatur inkubieren
4. Siehe 2.
5. 20 mg DAB (-20° C) in 20 ml Trispuffer lösen und 400 µl verdünnte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 5,8 ml Aquadest) hinzufügen. Lösung kurz vor Gebrauch herstellen und mit Mikrofilter filtrieren. Trispuffer ablaufen lassen, Objektträger um den Schnitt herum abtrocknen und für 5 min in DAB-Lösung einstellen

**Wichtig:** Mit DAB nur unter dem Abzug arbeiten, da kanzerogen. Alle mit DAB in Berührung gekommenen Gegenstände, die nicht weggeworfen werden, über Nacht in

ein Natrium-Hypochlorid-Bad geben und am nächsten Tag unter fließendem Wasser wässern

6. Objektträger gründlich mit Trispuffer mittels Spritzflasche spülen
7. Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe schwenken (70 % kurz, 96 % für 30 s, zweimal abs. Alkohol min. 2 min)
10. Zweimal klären in Xylol (Neo-Clear)
11. Einbetten in Roti Histokitt II (Firma Roth)

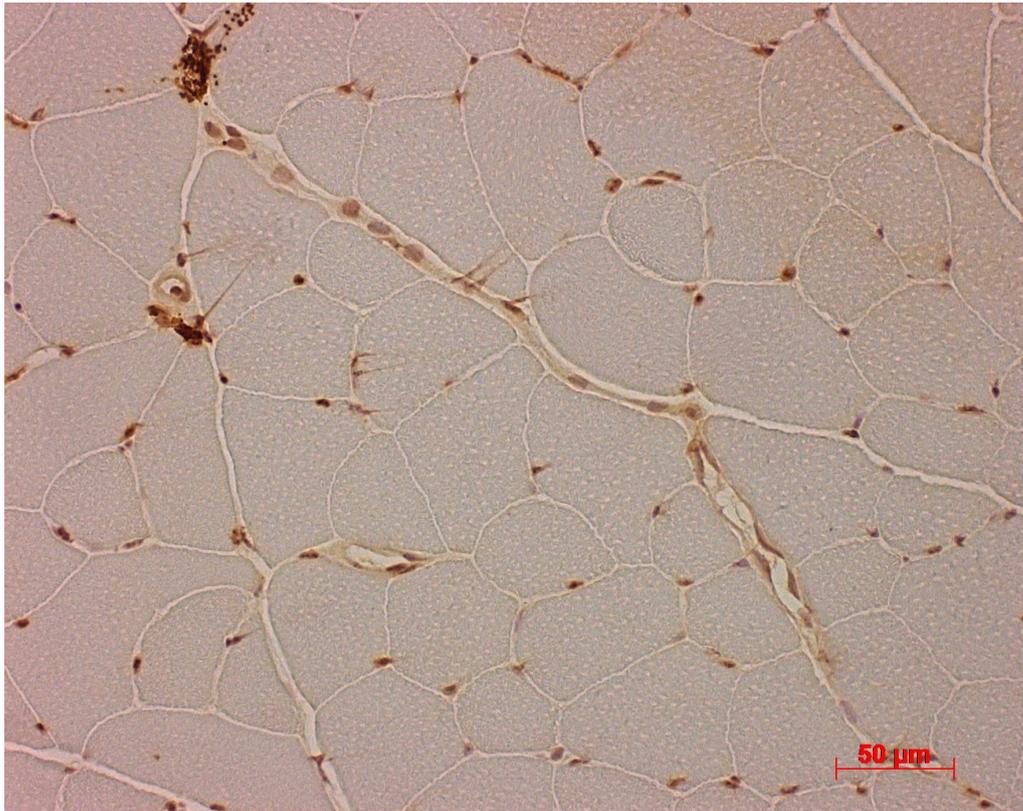
Zusammensetzung Trispuffer pH 7,6:

- Aquadest 12,2 g Tris/2 l
- Caveolin 150 µg: 61042 l
- Verdünnung: 1 : 100 (0,5 µl + 49,5 µl Trispuffer)
- Fixierung: Aceton 10 min
- Kontrolle: Orthomuskel-Aceton fixiert

### **3.3.8 Nachweis von Einschlusskörperchen: TDP-43 Reaktion**

Das TDP-43 gehört zu den heterogenen, nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNPs), die unter anderem eine wichtige Rolle in den meisten Genexpressionsmechanismen wie beispielsweise DNA-Transkription, Replikation, Splicing von mRNA Vorstufen und Translation von Proteinen spielen (Budini et al, 2012).

Es stellt ein säurebindendes, nukleophiles Protein dar, das normalerweise im Kern der Muskelzelle nachweisbar ist (Abb. 9). Dennoch konnte es auch im Sarkoplasma des Muskels und in RVs von h-IBM2 Patienten nachgewiesen werden (Weihl et al., 2008; Lloyd, 2010). Diese Reaktion war insbesondere wichtig für die Charakterisierung von Einschlüssen.



**Abb. 9:** TDP-43 Reaktion. *M. quadriceps femoris* einer sechs Monate alten, männlichen GNE<sup>+/-</sup> Maus; dunkelbraune Nuklei.

### Färbeprotokoll

Hierfür sollten 5 μm Schnitte und Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger verwendet werden, diese zuvor 10 min in Aceton fixieren. Die Schnitte über Nacht trocknen. Sollte keine unmittelbare Weiterverarbeitung erfolgen, werden die Objektträger einzeln in Alufolie verpackt und bei -80° C eingefroren. Diese dann vor Beginn auf Zimmertemperatur bringen. Die Präparate mit einem Diamantschreiber umkreisen und beschriften. Zu jedem Antikörpernachweis sollte eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle erfolgen (Orthomuskel, Aceton-fixiert).

1. Kurze Rehydrierung in 0,05 M Trispuffer pH 7,6
2. Trispuffer ablaufen lassen, Objektträger abtrocknen und mit je einem Tropfen Dual Endogenous Enzym Block (DAKO: S2003) 10 min inkubieren
3. Spülen mit Trispuffer und 5 min in frischen Trispuffer einstellen. Trispuffer ablaufen lassen, Objektträger vorsichtig um den Schnitt herum abtrocknen und in eine feuchte Kammer geben
4. 50 μl Primär-Antikörper pro Schnitt auftragen (Verdünnung 1 : 3500 in Trispuffer) und über Nacht bei 4° C inkubieren (nicht auf der Negativkontrolle)
5. Den Objektträger mit Trispuffer spülen und dreimal je 10 min in Trispuffer einstellen

6. Den Objektträger um den Schnitt herum vorsichtig trocknen und je zwei Tropfen Biotinylated Link (LSAB-Kit, Dako) auftragen, dann 30 min bei Raumtemperatur inkubieren (einschließlich Negativkontrolle)
7. Spülen mit dem Puffer, einstellen und sofort den Objektträger um den Schnitt herum vorsichtig trocknen, je zwei Tropfen Streptavidin-HRP (LSAB-Kit, Dako) auftragen und 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
8. Spülen mit dem Puffer, einstellen und sofort den Objektträger um den Schnitt herum vorsichtig trocknen, dann für 10 min in DAB-Lösung inkubieren. Dazu 1 ml DAB-Substrat-Puffer und einen Tropfen DAB (LSAB-Kit, Dako) mischen und je 50 µl auf Präparat auftragen (zwei Wochen bei 2-8° C stabil)  
**Wichtig:** Mit DAB nur unter dem Abzug arbeiten, da kanzerogen. Alle mit DAB in Berührung gekommenen Gegenstände, die nicht weggeworfen werden, über Nacht in ein Natrium-Hypochlorid-Bad geben und am nächsten Tag unter fließendem Wasser wässern
9. Den Objektträger gründlich mit Trispuffer mittels Spritzflasche spülen
10. Spülen in Leitungswasser für 5 min
11. Gegenfärben mit Hämalaun 1 : 8 für 1 min
12. Kurzes Spülen und Bläuen in frischem Leitungswasser
13. Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe schwenken (70 % kurz, 96 % für 30 s, zweimal abs. Alkohol min. 2 min)
14. Zweimal klären in Xylol (Neo-Clear)
15. Einbetten in Roti Histokitt II (Firma Roth)

### 3.3.9 Auswertung der histologischen Untersuchungen

Die histologisch aufbereiteten Präparate entstammten den 38 getöteten heterozygoten *GNE*<sup>+/-</sup>-Mäusen und homozygoten C57BL/6 Kontrolltieren. Je Tier wurden drei Muskeln, M. gastrocnemius, M. quadriceps femoris und M. tibialis anterior gefärbt, so dass je Färbemethode 114 Präparate zur Verfügung standen.

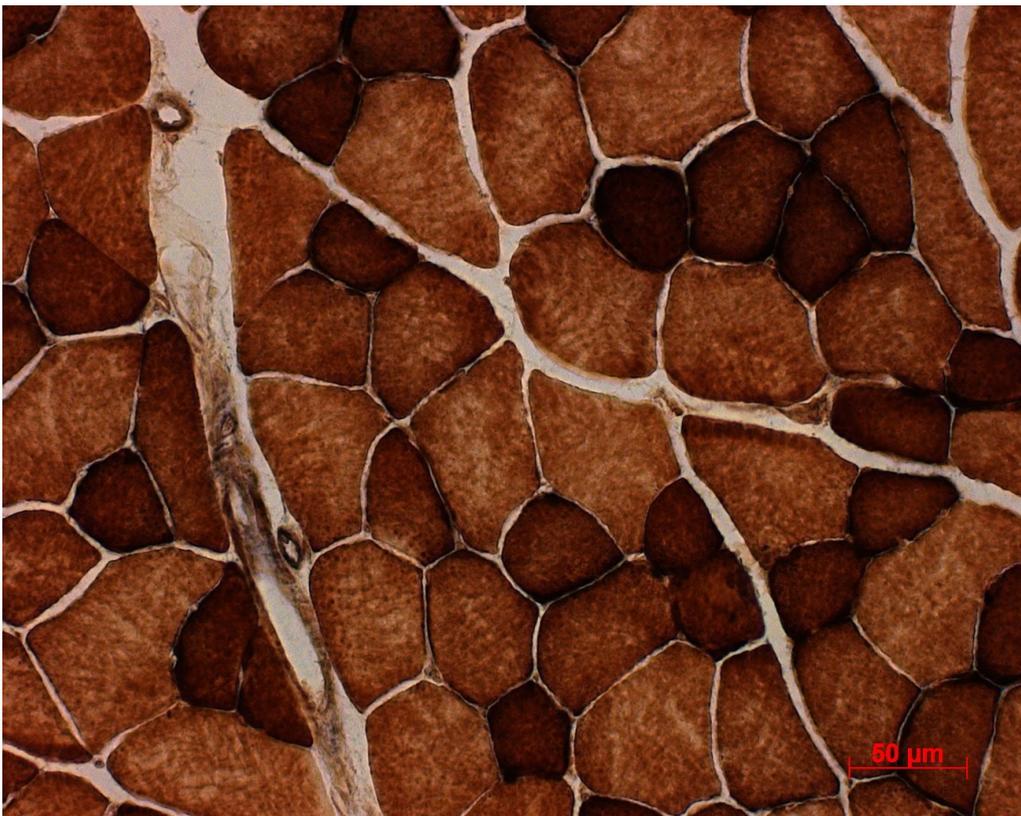
Die Auswertung aller Muskelpräparate fand verblindet statt, um eine möglichst objektive Beurteilung zu gewährleisten. Dies erfolgte durch Abkleben des auf dem Objektträger befindlichen Identifizierungscodes und anschließende zufällige Durchnummerierung. Die Gruppenzugehörigkeit der Präparate war somit nicht bekannt. Alle Präparate wurden auf Anzahl der Typ-I-Fasern, Anzahl binnenständiger Kerne, Faserdurchmesser von Typ-I- und Typ-II-Muskelfasern als auch auf Vorkommen von RVs untersucht und anschließend auf Altersveränderungen durchgeschaut. Zu den verwendeten Geräten gehörte ein Axioplan Lichtmikroskop der Firma ZEISS, eine integrierte AxioCam HRc Kamera der Firma ZEISS, ein FUJITSU PC der Firma SIEMENS sowie die entsprechende Axio Vision 3.1 Software.

### 3.3.10 Typ-I-Muskelfasern

Es wurden Muskelpräparate der C57BL/6 Mäuse als auch der *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse auf die Verteilung der Typ-I-Muskelfasern untersucht, weil Typ-I-Muskelfasern mit dem Voranschreiten der h-IBM2 dominieren (Nonaka et al., 1981; Malicdan, 2008).

Da die Typ-I-Muskelfaseratrophie häufig bei hereditären Myopathien auftritt (Bianchi und Riede, 2004), sollten Typ-I-Muskelfasern vergleichend sowohl bei heterozygoten *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen als auch bei den C57BL/6 Kontrollmäusen untersucht werden.

Für die Erfassung der Typ-I-Muskelfasern war ursprünglich die für die Unterscheidung der Muskelfasern empfohlene ATP-Färbung geplant, allerdings war es am Mausmuskel nur schwer möglich mit dieser Färbemethode Typ-I- und Typ-II-Muskelfasern zu unterscheiden (Abb. 6), so dass die quantitative Bestimmung anhand der COX/SDH Färbung vorgenommen wurde (Abb. 10). Unter 20facher Vergrößerung konnten je Präparat 150 Fasern mithilfe des Axioplan Mikroskops (Firma ZEISS), integrierter Kamera (AxioCam HRc der Firma ZEISS) und Axio Vision 3.1 gezählt und anhand der Fasertypen unterschieden werden. Insgesamt wurden mehr als 17.000 Muskelfasern typisiert.



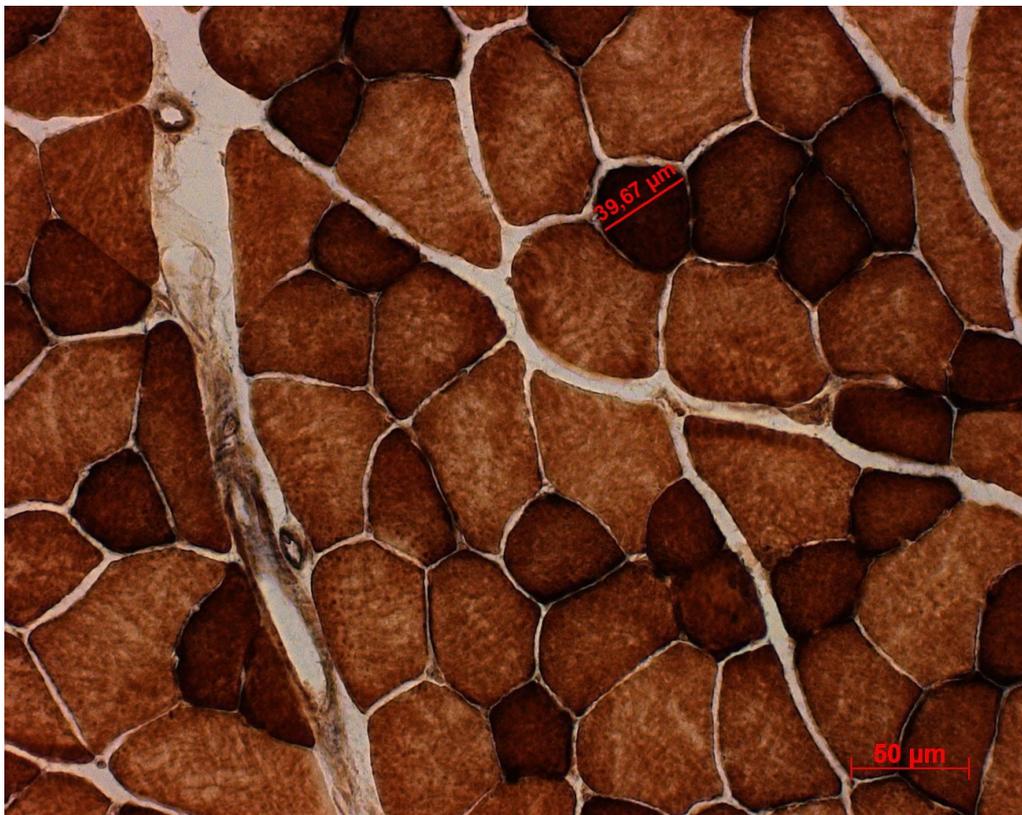
**Abb. 10:** COX/SDH Färbung, *M. quadriceps femoris* einer sechs Monate alten, männlichen *GNE*<sup>+/-</sup> Maus; dunkle Typ-I-Fasern und helle Typ-II-Fasern.

### 3.3.11 Muskelfaserdurchmesser

Die Biopsate der h-IBM2 Patienten weisen Veränderungen der Muskelfasern in Form von kleinen, angulären, atrophischen Fasern auf (Malicdan et al., 2007). Um eventuelle Größenveränderungen in den Muskeln der heterozygoten *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse zu eruieren, wurden die Durchmesser von Typ-I- und Typ-II-Fasern bestimmt.

Die Durchmesserbestimmung erfolgte anhand der COX/SDH gefärbten Präparate unter 20facher Vergrößerung. Je Präparat wurden 25 Typ-I- und 25 Typ-II-Faserdurchmesser, somit insgesamt 5700 Muskelfaserdurchmesser erfasst.

Transversal geschnittene, rundlich bis polygonal erscheinende Muskelfasern wurden an der breitesten Stelle gemessen (Abb. 11), schräg angeschnittene Fasern, die eine länglich ovale bis rechteckige Form aufweisen, wurden an der breitesten Stelle des schmälere Durchmessers erfasst (Dubowitz und Sewry, 2007).



**Abb. 11:** COX/SDH Färbung, *M. quadriceps femoris* einer sechs Monate alten, männlichen *GNE*<sup>+/-</sup> Maus; Durchmesserbestimmung.

### 3.3.12 Binnenständige Kerne

Binnenständige Kerne finden sich in einer Vielzahl von myopathischen Erkrankungen und stellen unspezifische Zeichen von Regenerationsvorgängen im Skelettmuskel dar (Dubowitz und Sewry, 2007; Robbins et al., 2010). Als mögliche Ursachen der abnormen Migration der

Kerne werden verzögerte Reifungsprozesse oder eine gestörte Funktion des Zytoskeletts angesehen, bei sportlich aktiven Erwachsenen können jedoch ebenfalls vereinzelt binnenständige Kerne auftreten (Vladutiu und Idiculla, 1997).

Die Bestimmung binnenständiger Kerne aller Präparate erfolgte anhand der HE-Färbung, da in dieser Färbung die basophilen Kernen optimal von eosinophilen Strukturen wie Zellplasmaproteinen abgegrenzt und gezählt werden konnten (Abb. 12). Je Präparat wurden 150 und somit insgesamt mehr als 17.000 Muskelfasern auf binnenständige und zentralisierte Kerne untersucht.

Mit dem Axioplan Mikroskop der Firma ZEISS und einer integrierten Kamera (AxioCam HRc der Firma ZEISS) konnte jedes Präparat unter 20facher Vergrößerung angesehen, mit dem Axio Vision Programms 3.1 auf den Computer übertragen und ausgezählt werden. Die Zellen mit binnenständigen Kernen konnten markiert und pro Präparat erfasst werden.

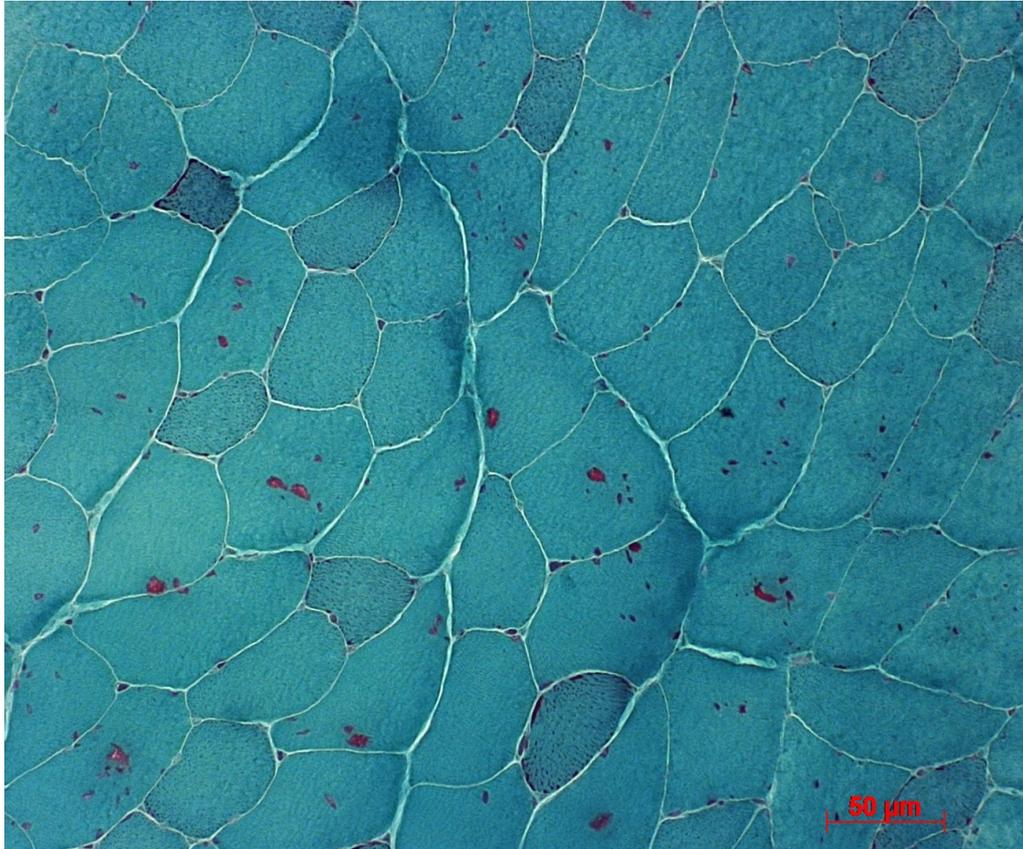


**Abb. 12:** HE-Färbung, *M. quadriceps femoris* einer 18 Monate alten, weiblichen GNE+/- Maus; violette binnenständige Kerne.

### 3.3.13 RVs

RVs stellen ein charakteristisches Merkmal der h-IBM2 dar, weshalb die Präparate auf das Vorkommen von RVs durchgesehen wurden.

Die Bestimmung der RVs sollte ursprünglich sowohl an den durch Kongorot gefärbten Präparaten als auch mittels Gomori-Trichrom Färbung erfolgen. Der Nachweis mittels Kongorot war aufgrund der schwachen Anfärbung nur schwer möglich (Abb. 5). Mit der Gomori-Trichrom Färbung schienen jedoch Vakuolen erkennbar, so dass die Bestimmung mithilfe dieser Färbemethode vorgenommen wurde (Abb. 13). Es wurden insgesamt 114 Präparate mit je 150 Fasern auf das Vorhandensein von RVs geprüft.



**Abb. 13:** Gomori-Trichrom Färbung (modifiziert). *M. quadriceps femoris* einer 18 Monate alten, weiblichen *GNE*<sup>+/-</sup> Maus; sichtbar sind größtenteils zentral lokalisierte, rötlich bis pink imponierende, geränderte Strukturen.

### 3.3.14 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Präparate wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. G. Stoltenburg-Didinger an der Charité Berlin (Universitätsmedizin Berlin) und von Herrn Prof. Dr. J. Weis an der Rheinisch-Westfaelischen Technischen Hochschule Aachen (RWTH Aachen) durchgeführt. Untersucht wurden Muskelpräparate der *Mm. gastrocnemii*, *Mm. quadriceps femoris* und *Mm. tibialis anteriores* junger und alter *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse als auch junger und alter C57BL/6 Kontrolltiere.

### 3.3.15 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte hauptsächlich mit dem Datenverarbeitungsprogramm Microsoft Excel 2003, sowie mit dem Datenverarbeitungsprogramm Stata 10.1. Verglichen wurden die jeweiligen Muskeln von 19 C57BL/6 Tieren und 20 *GNE*+/- Tieren. Die 24 und 80 Wochen alten Mäuse wurden hinsichtlich der Muskelfaserdurchmesser, der anteiligen Typ-I-Muskelfasern, dem Anteil binnenständiger Kerne, sowie dem Vorhandensein von RVs verglichen.

Zur Auswertung der Daten dienten neben dem t-Test auch der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und der Welsh-Test. Als signifikante Unterschiede gelten Vergleiche mit  $p < .05$ . Eine erste visuelle Analyse der Histogramme ergab, dass die Voraussetzungen für die Anwendung des t-Tests oftmals nicht erfüllt waren. Der t-Test wurde demnach nur verwendet, wenn die Unabhängigkeit der Stichproben und die Normalverteilung der Daten mittels Shapiro-Wilk-Test und die Varianzhomogenität mittels F-Test bestätigt wurden ( $p > .05$ ). Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurde verwendet, wenn der Shapiro-Wilk-Test die Normalverteilungsannahme nicht bestätigte ( $p < .05$ ). Der Welsh-Test, ein korrigierter t-Test kam zur Anwendung, wenn der F-Test die Varianzhomogenitätsannahme nicht bestätigte ( $p < .05$ ). Errechnet wurden neben Mittelwerten, Standardabweichungen ( $M \pm SD$ ) und p-Werten auch die Mediane (MD), um einen Einblick in die Streuung der Variablen zu geben. Der Shapiro-Wilk-Test als auch der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurden freundlicherweise von Dipl.-Soz. N. Kastirke mit Stata 10.1 berechnet.

## 4 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden zunächst der äußere Aspekt, Laufradergebnisse, Gewicht und CK-Werte von *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen und C57BL/6 Tieren in Abhängigkeit des Alters ausgewertet, im Anschluss folgt die Darstellung und Auswertung der histologischen Untersuchungen beider Gruppen.

### 4.1 Äußerer Aspekt/Phänotyp

Die *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren keine phänotypischen Unterschiede (Abb. 14). Es konnten weder Veränderungen der Motilität beobachtet werden, noch zeigten sich Auffälligkeiten hinsichtlich der Beschaffenheit des Fells oder der Haut.

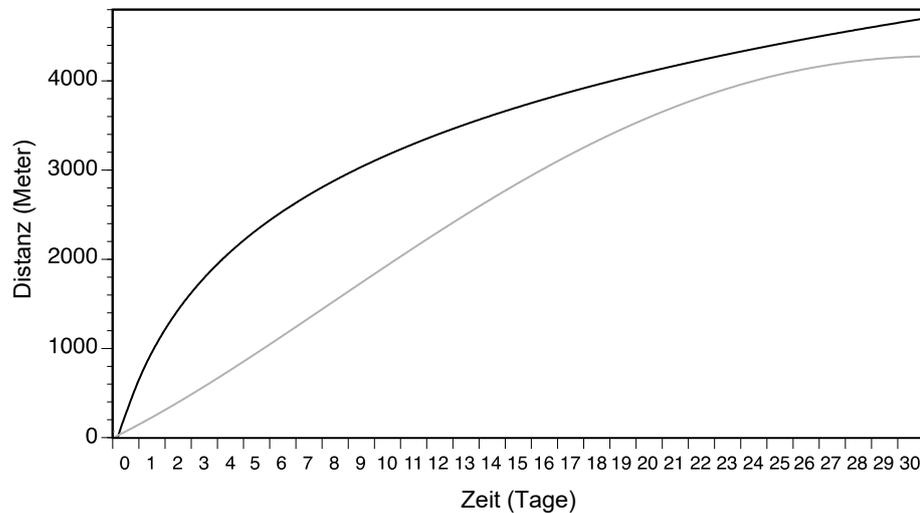


**Abb. 14:** Phänotyp einer *GNE*<sup>+/-</sup> Maus und einer C57BL/6 Maus; aufgenommen im Muskellabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Halle (Saale).

### 4.2 Laufradergebnisse

Unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Horstkorte wurde am Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg die Leistung der *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse im Vergleich zu den C57BL/6 Kontrollmäusen gemessen. Es wurden sechs Monate alte *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse und C57BL/6 Mäuse über einen Zeitraum von insgesamt 30 Tagen hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit mittels Laufradtest beobachtet und untersucht. Es zeigte sich eine deutliche

Leistungseinschränkung der *GNE*<sup>+/-</sup> Tiere. Eine signifikante Leistungsminderung um 22 % konnte bis zum vierten Tag nachgewiesen werden. Zwischen dem 21.-30. Tag zeigten die *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse eine Leistungsminderung um 10-15 % (Hanisch et al., 2013).



**Abb. 15:** Vergleich der Laufradergebnisse von C57BL/6 Mäusen und *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen. Schwarze Linie C57BL/6 Mäuse, graue Linie *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse (in Anlehnung an Hanisch et al., 2013).

### 4.3 Auswertung Gewicht

Das Körpergewicht als auch die Einzelgewichte der Mm. gastrocnemii, Mm. quadriceps femoris und Mm. tibiales anteriores werden durch Mittelwerte und Median dargestellt (Tabelle 2 und Tabelle 3).

Zwischen den Gewichten der jungen C57BL/6 Mäuse und der jungen *GNE*<sup>+/-</sup> Tiere konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Die 80 Wochen alten *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse zeigten hingegen im Vergleich zu den 80 Wochen alten C57BL/6 Mäusen ein signifikant höheres Gewicht der Mm. quadriceps femoris sowie der Mm. tibiales anteriores. Sowohl die Mittelwerte, als auch die Mediane beider Muskeln sind bei den alten *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen höher als in der Kontrollgruppe.

Ein signifikanter Unterschied des Gesamtgewichts von heterozygoten und homozygoten Mäusen konnte mit zunehmendem Alter jedoch nicht beobachtet werden.

**Tabelle 2:** Vergleich der Gewichte 24 Wochen alter und 80 Wochen alter Mäuse. Verglichen werden *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps* und *M. tibialis anterior* von insgesamt 38 männlichen und weiblichen C57BL/6 Mäusen und GNE+/- Mäusen.

Mausmodelle	Vergleich 24 Wochen alter C57BL/6 und GNE+/- Mäuse			Vergleich 80 Wochen alter C57BL/6 und GNE+/- Mäuse			
		C57BL/6 (24W)	GNE+/- (24W)	p	C57BL/6 (80W)	GNE+/- (80W)	p
Geschlecht [m : w]		3 : 6	5 : 2		4 : 6	5 : 7	
Gewicht gesamt [g]	M	25,82±1,55	27,69±3,39	0.16 <sup>a</sup>	28,78±3,76	-	-
	MD	25,55	28,80	-	30,70	-	-
<i>M. gastrocnemius</i> [mg]	M	147,4±21,79	165,81±25,367	0.14 <sup>a</sup>	134,89±29,69	159,78±38,54	0.11 <sup>a</sup>
	MD	150,00	160,00	-	129,7	148,9	-
<i>M. quadriceps femoris</i> [mg]	M	198,46±27,11	208,08±35,97	0.87 <sup>b</sup>	177,34±25,21	211,26±37,43	0.03 <sup>b</sup>
	MD	190,00	209,00	-	182,95	211,7	-
<i>M. tibialis anterior</i> [mg]	M	49,11±9,82	55,52±7,15	0.19 <sup>a</sup>	47,45±7,09	62,55±13,89	0.005 <sup>a</sup>
	MD	50,00	55,00	-	46,95	59,35	-

P-Wert durch <sup>a</sup> t-Test, <sup>b</sup> Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, <sup>c</sup> Welch-Test ermittelt; signifikante Werte ( $p < .05$ ) sind fett hervorgehoben; W=Wochen, m=männlich, w=weiblich, g=Gramm, mg=Milligramm, M=Mittelwert, SD=Standardabweichung, MD=Median, -=nicht erhoben.

**Tabelle 3:** Vergleich der Gewichte 24 und 80 Wochen alter Mäuse. Verglichen werden *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps* und *M. tibialis anterior* von insgesamt 38 männlichen und weiblichen C57BL/6 und GNE+/- Mäusen.

Mausmodelle	Vergleich 24 Wochen und 80 Wochen alter C57BL/6 Mäuse			Vergleich 24 Wochen und 80 Wochen alter GNE+/- Mäuse			
		C57BL/6 (24W)	C57BL/6 (80W)	p	GNE+/- (24W)	GNE+/- (80W)	p
Geschlecht [m : w]		3 : 6	4 : 6		5 : 2	5 : 7	
Gewicht gesamt [g]	M	25,82±1,55	28,78±3,76	0.07 <sup>a</sup>	27,69±3,39	-	-
	MD	25,55	30,70	-	28,80	-	-
<i>M. gastrocnemius</i> [mg]	M	147,4±21,79	134,89±29,69	0.31 <sup>a</sup>	165,81±25,367	159,78±38,54	0.72 <sup>a</sup>
	MD	150,00	129,7	-	160,00	148,9	-
<i>M. quadriceps femoris</i> [mg]	M	198,46±27,11	177,34±25,21	0.08 <sup>b</sup>	208,08±35,97	211,26±37,43	0.93 <sup>b</sup>
	MD	190,00	182,95	-	209,00	211,7	-
<i>M. tibialis anterior</i> [mg]	M	49,11±9,82	47,45±7,09	0.81 <sup>b</sup>	55,52±7,15	62,55±13,89	0.10 <sup>b</sup>
	MD	50,00	46,95	-	55,00	59,35	-

P-Wert durch <sup>a</sup> t-Test, <sup>b</sup> Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, <sup>c</sup> Welch-Test ermittelt; signifikante Werte ( $p < .05$ ) sind fett hervorgehoben; W=Wochen, m=männlich, w=weiblich, g=Gramm, mg=Milligramm, M=Mittelwert, SD=Standardabweichung, MD=Median, -=nicht erhoben.

#### 4.4 CK-Werte

Im Folgenden werden die gemessenen CK-Werte der heterozygoten GNE+/- Mäuse als auch der C57BL/6 Mäuse dargestellt und ausgewertet (Tabelle 4 und Tabelle 5).

Im Alter kommt es zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der CK-Werte sowohl bei den heterozygoten GNE+/- Mäusen als auch in der Kontrollgruppe. Weiterhin fällt auf, dass

die CK-Werte der *GNE*+/- Tiere sowohl bei den jungen, 24 Wochen alten Tieren, als auch bei den alten, 80 Wochen alten Tieren, im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe deutlich höher sind. Mittels t-Test konnte jedoch auch hier keine signifikante Erhöhung nachgewiesen werden, somit lassen sich die Ergebnisse nicht auf andere Gruppen übertragen.

**Tabelle 4:** Vergleich der CK-Werte 24 Wochen alter und 80 Wochen alter Mäuse. Verglichen werden *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps* und *M. tibialis anterior* von insgesamt 38 männlichen und weiblichen C57BL/6 und *GNE*+/- Mäusen.

Mausmodelle	Vergleich 24 Wochen alter C57BL/6 und <i>GNE</i> +/- Mäuse			Vergleich 80 Wochen alter C57BL/6 und <i>GNE</i> +/- Mäuse		
	C57BL/6 (24W)	<i>GNE</i> +/- (24W)	p	C57BL/6 (80W)	<i>GNE</i> +/- (80W)	p
Geschlecht [m : w]	3 : 6	5 : 2		4 : 6	5 : 7	
CK-Werte M	216,38±131,04	262,1±115,51	0.50 <sup>a</sup>	253,63±154,7	336,14±171,86	0.25 <sup>a</sup>
[µmol/l×s] MD	163,90	290,77	-	207,05	384,97	-

*P*-Wert durch <sup>a</sup> t-Test, <sup>b</sup> Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, <sup>c</sup> Welch-Test ermittelt; signifikante Werte (*p*<.05) sind fett hervorgehoben; W=Wochen, m=männlich, w=weiblich, g=Gramm, mg=Milligramm, M=Mittelwert, SD=Standardabweichung, MD=Median, -=nicht erhoben.

**Tabelle 5:** Vergleich der CK-Werte 24 und 80 Wochen alter Mäuse. Verglichen werden *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps* und *M. tibialis anterior* von insgesamt 38 männlichen und weiblichen C57BL/6 und *GNE*+/- Mäusen.

Mausmodelle	Vergleich 24 Wochen und 80 Wochen alter C57BL/6 Mäuse			Vergleich 24 Wochen und 80 Wochen alter <i>GNE</i> +/- Mäuse		
	C57BL/6 (24W)	C57BL/6 (80W)	p	<i>GNE</i> +/- (24W)	<i>GNE</i> +/- (80W)	p
Geschlecht [m : w]	3 : 6	4 : 6	-	5 : 2	5 : 7	-
CK-Werte M	216,38±131,04	253,63±154,7	0.58 <sup>a</sup>	262,1±115,51	336,14±171,86	0.36 <sup>a</sup>
[µmol/l×s] MD	163,90	207,05	-	290,77	384,97	-

*P*-Wert durch <sup>a</sup> t-Test, <sup>b</sup> Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, <sup>c</sup> Welch-Test ermittelt; signifikante Werte (*p*<.05) sind fett hervorgehoben; W=Wochen, m=männlich, w=weiblich, g=Gramm, mg=Milligramm, M=Mittelwert, SD=Standardabweichung, MD=Median, -=nicht erhoben.

## 4.5 Häufigkeitsverteilung von Typ-I-Muskelfasern

Im Folgenden werden die Anteile der Typ-I-Muskelfasern innerhalb der verschiedenen Muskeln, gemessen an heterozygoten Tieren und Kontrollmäusen in Abhängigkeit des Alters dargestellt (Tabelle 6, Tabelle 7, Abb. 16).

Weder bei den vergleichenden Untersuchungen der beiden Gruppen identischen Alters noch in Bezug auf das zunehmende Alter konnten signifikante Unterschiede der Typ-I-Muskelfasern beobachtet werden.

**Tabelle 6:** Häufigkeitsverteilung der Typ-I-Muskelfasern 24 Wochen alter und 80 Wochen alter Mäuse. Verglichen werden *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps* und *M. tibialis anterior* von insgesamt 38 männlichen und weiblichen C57BL/6 und GNE+/- Mäusen.

Mausmodelle	Vergleich 24 Wochen alter C57BL/6 und GNE+/- Mäuse			Vergleich 80 Wochen alter C57BL/6 und GNE+/- Mäuse			
	C57BL/6 (24W)	GNE+/- (24W)	P	C57BL/6 (80W)	GNE+/- (80W)	P	
Geschlecht [m : w]	3 : 6	5 : 2		4 : 6	5 : 7		
M. gastrocnemius [%]	M	45,94 ± 0,13	46,33 ± 0,13	0.96 <sup>a</sup>	40,67 ± 0,17	37,13 ± 0,14	0.61 <sup>a</sup>
	MD	44,74	49,51	-	32,09	37,50	-
M. quadriceps femoris [%]	M	46,63 ± 0,09	50,55 ± 0,17	0.57 <sup>a</sup>	41,81 ± 0,13	41,35 ± 0,09	0.93 <sup>a</sup>
	MD	45,91	53,85	-	40,59	44,52	-
M. tibialis anterior [%]	M	57,35 ± 0,07	53,38 ± 0,10	0.41 <sup>a</sup>	56,21 ± 0,18	50,05 ± 0,10	0.21 <sup>a</sup>
	MD	57,34	54,00	-	62,29	49,39	-

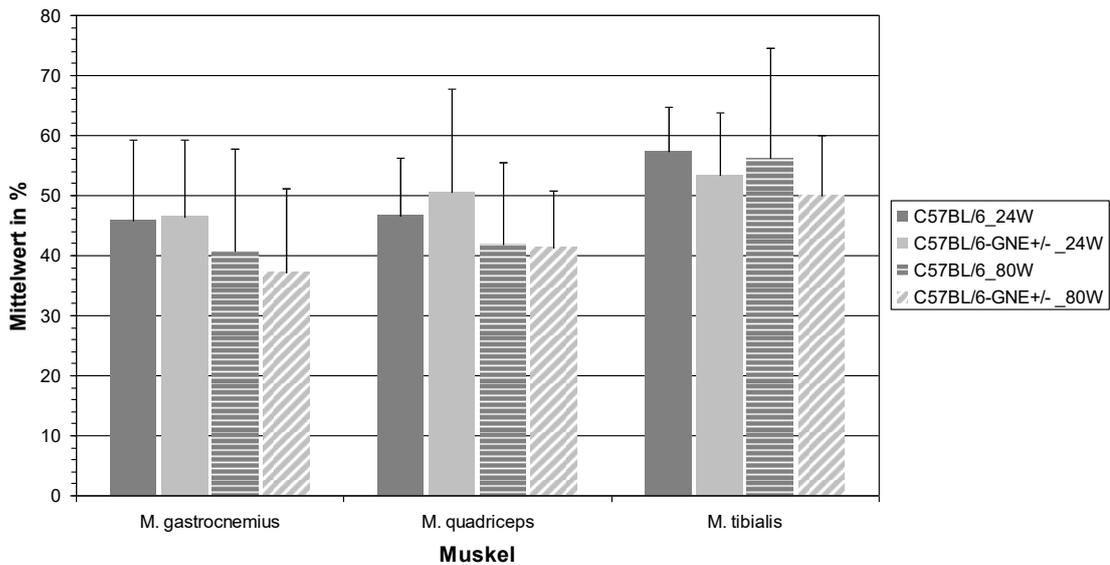
P-Wert durch <sup>a</sup> t-Test, <sup>b</sup> Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, <sup>c</sup> Welch-Test ermittelt; signifikante Werte ( $p < .05$ ) sind fett hervorgehoben; W=Wochen, m=männlich, w=weiblich, g=Gramm, mg=Milligramm, M=Mittelwert, SD=Standardabweichung, MD=Median, -=nicht erhoben.

**Tabelle 7:** Häufigkeitsverteilung der Typ-I-Muskelfasern von 24 und 80 Wochen alten Mäusen. Verglichen werden *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps* und *M. tibialis anterior* von insgesamt 38 männlichen und weiblichen C57BL/6 und GNE+/- Mäusen.

Mausmodelle	Vergleich 24 Wochen und 80 Wochen alter C57BL/6 Mäuse			Vergleich 24 Wochen und 80 Wochen alter GNE+/- Mäuse			
	C57BL/6 (24W)	C57BL/6 (80W)	P	GNE+/- (24W)	GNE+/- (80W)	P	
Geschlecht [m : w]	3 : 6	4 : 6		5 : 2	5 : 7		
M. gastrocnemius [%]	M	45,94 ± 0,13	40,67 ± 0,17	0.48 <sup>a</sup>	46,33 ± 0,13	37,13 ± 0,14	0.18 <sup>a</sup>
	MD	44,74	32,09		49,51	37,50	
M. quadriceps femoris [%]	M	46,63 ± 0,09	41,81 ± 0,13	0.40 <sup>a</sup>	50,55 ± 0,17	41,35 ± 0,09	0.15 <sup>a</sup>
	MD	45,91	40,59	-	53,85	44,52	-
M. tibialis anterior [%]	M	57,35 ± 0,07	56,21 ± 0,18	0.87 <sup>c</sup>	53,38 ± 0,10	50,05 ± 0,10	0.50 <sup>a</sup>
	MD	57,34	62,29	-	54,00	49,39	-

P-Wert durch <sup>a</sup> t-Test, <sup>b</sup> Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, <sup>c</sup> Welch-Test ermittelt; signifikante Werte ( $p < .05$ ) sind fett hervorgehoben; W=Wochen, m=männlich, w=weiblich, g=Gramm, mg=Milligramm, M=Mittelwert, SD=Standardabweichung, MD=Median, -=nicht erhoben.

## Typ-I-Muskelfasern



**Abb. 16:** Anteil der Typ-I-Fasern von *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps femoris* und *M. tibialis anterior* von 24 und 80 Wochen alten C57BL/6 und GNE+/- Mäusen.

## 4.6 Beurteilung der Muskelfaserdurchmesser

Nachfolgend werden die Durchmesser der Typ-I- und Typ-II-Muskelfasern von heterozygoten GNE+/- Tieren und homozygoten C57BL/6 Kontrollmäusen im Hinblick auf die verschiedenen Muskeln und Altersklassen dargestellt (Tabelle 8, Tabelle 9, Tabelle 10, Tabelle 11, Abb. 17, Abb. 18).

Mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ließ sich eine mit dem Alter auftretende, signifikante Durchmesserabnahme im *M. tibialis anterior* der C57BL/6 Kontrolltiere in den Typ-II-Muskelfasern nachweisen.

Sonst ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

**Tabelle 8:** Vergleich der Durchmesser von Typ-I-Fasern 24 Wochen alter und 80 Wochen alter Mäuse. Verglichen werden *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps* und *M. tibialis anterior* von insgesamt 38 männlichen und weiblichen C57BL/6 und GNE+/- Mäusen.

Mausmodelle	Vergleich 24 Wochen alter C57BL/6 und GNE+/- Mäuse			Vergleich 80 Wochen alter C57BL/6 und GNE+/- Mäuse			
	C57BL/6 (24W)	GNE+/- (24W)	p	C57BL/6 (80W)	GNE+/- (80W)	p	
Geschlecht [m : w]	3 : 6	4 : 6		5 : 2	5 : 7		
M. gastrocnemius [µm]	M	30,21±3,51	30,81±4,18	0.64 <sup>b</sup>	30,89±5,49	27,52±8,06	0.23 <sup>b</sup>
	MD	30,87	33,17	-	33,44	31,96	-
M. quadriceps femoris [µm]	M	29,66±3,01	33,47±4,30	0.06 <sup>b</sup>	27,26±7,61	27,32±7,68	0.83 <sup>b</sup>
	MD	28,22	31,55	-	30,26	31,33	-
M. tibialis anterior [µm]	M	29,46±3,91	31,27±2,77	0.49 <sup>b</sup>	22,59±8,40	27,30±8,40	0.06 <sup>b</sup>
	MD	29,47	30,48	-	25,93	30,51	-

P-Wert durch <sup>a</sup> t-Test, <sup>b</sup> Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, <sup>c</sup> Welch-Test ermittelt; signifikante Werte ( $p < .05$ ) sind fett hervorgehoben; W=Wochen, m=männlich, w=weiblich, g=Gramm, mg=Milligramm, M=Mittelwert, SD=Standardabweichung, MD=Median, -=nicht erhoben.

**Tabelle 9:** Vergleich der Durchmesser von Typ-I-Fasern 24 und 80 Wochen alter Mäuse. Verglichen werden *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps* und *M. tibialis anterior* von insgesamt 38 männlichen und weiblichen C57BL/6 und GNE+/- Mäusen.

Mausmodelle	Vergleich 24 Wochen und 80 Wochen alter C57BL/6 Mäuse			Vergleich 24 Wochen und 80 Wochen alter GNE+/- Mäuse			
	C57BL/6 (24W)	C57BL/6 (80W)	p	GNE+/- (24W)	GNE+/- (80W)	p	
Geschlecht [m : w]	3 : 6	5 : 2		4 : 6	5 : 7		
M. gastrocnemius [µm]	M	30,21±3,51	30,89±5,49	0.42 <sup>b</sup>	30,81±4,18	27,52±8,06	0.26 <sup>b</sup>
	MD	30,87	33,44	-	33,17	31,96	-
M. quadriceps femoris [µm]	M	29,66±3,01	27,26±7,61	0.83 <sup>b</sup>	33,47±4,30	27,32±7,68	0.11 <sup>b</sup>
	MD	28,22	30,26	-	31,55	31,33	-
M. tibialis anterior [µm]	M	29,46±3,91	22,59±8,40	0.08 <sup>b</sup>	31,27±2,77	27,30±8,40	0.67 <sup>b</sup>
	MD	29,47	25,93	-	30,48	30,51	-

P-Wert durch <sup>a</sup> t-Test, <sup>b</sup> Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, <sup>c</sup> Welch-Test ermittelt; signifikante Werte ( $p < .05$ ) sind fett hervorgehoben; W=Wochen, m=männlich, w=weiblich, g=Gramm, mg=Milligramm, M=Mittelwert, SD=Standardabweichung, MD=Median, -=nicht erhoben.

**Tabelle 10:** Vergleich der Durchmesser von Typ-II-Fasern 24 Wochen alter und 80 Wochen alter Mäuse. Verglichen werden *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps* und *M. tibialis anterior* von insgesamt 38 männlichen und weiblichen C57BL/6 und GNE+/- Mäusen.

Mausmodelle	Vergleich 24 Wochen alter C57BL/6 und GNE+/- Mäuse			Vergleich 80 Wochen alter C57BL/6 und GNE+/- Mäuse			
		C57BL/6 (24W)	GNE+/- (24W)	p	C57BL/6 (80W)	GNE+/- (80W)	p
Geschlecht [m : w]		3 : 6	4 : 6		5 : 2	5 : 7	
M. gastrocnemius [µm]	M	35,44±10,35	38,97±4,57	0.64 <sup>b</sup>	39,58±5,34	34,66±10,77	0.48 <sup>b</sup>
	MD	36,87	38,33	-	40,08	39,69	-
M. quadriceps femoris [µm]	M	37,03±8,08	42,10±6,19	0.27 <sup>b</sup>	34,84±9,64	40,06±4,80	0.43 <sup>b</sup>
	MD	37,16	40,85	-	37,14	39,86	-
M. tibialis anterior [µm]	M	38,17±10,92	39,42±5,25	0.56 <sup>b</sup>	30,32±10,91	39,21±5,00	0.05 <sup>b</sup>
	MD	42,10	39,45	-	34,74	38,80	-

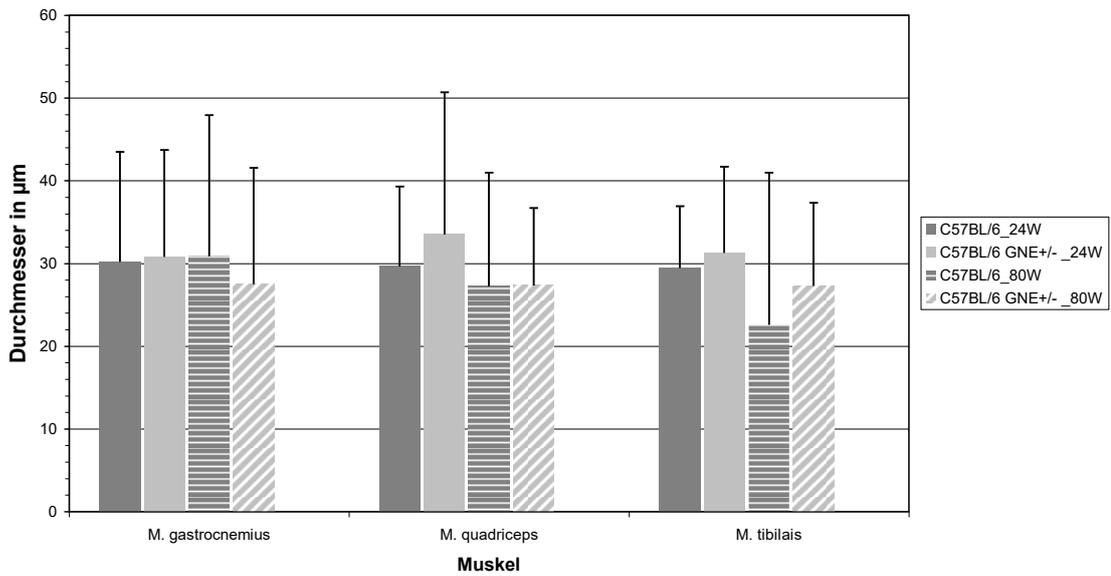
P-Wert durch <sup>a</sup> t-Test, <sup>b</sup> Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, <sup>c</sup> Welch-Test ermittelt; signifikante Werte ( $p < .05$ ) sind fett hervorgehoben; W=Wochen, m=männlich, w=weiblich, g=Gramm, mg=Milligramm, M=Mittelwert, SD=Standardabweichung, MD=Median, -=nicht erhoben.

**Tabelle 11:** Vergleich der Durchmesser von Typ-II-Fasern 24 und 80 Wochen alter Mäuse. Verglichen werden *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps* und *M. tibialis anterior* von insgesamt 38 männlichen und weiblichen C57BL/6 und GNE+/- Mäusen.

Mausmodelle	Vergleich 24 Wochen und 80 Wochen alter C57BL/6 Mäuse			Vergleich 24 Wochen und 80 Wochen alter GNE+/- Mäuse			
		C57BL/6 (24W)	C57BL/6 (80W)	p	GNE+/- (24W)	GNE+/- (80W)	p
Geschlecht [m : w]		3 : 6	5 : 2		4 : 6	5 : 7	
M. gastrocnemius [µm]	M	35,44±10,35	39,58±5,34	0.37 <sup>b</sup>	38,97±4,57	34,66±10,77	0.75 <sup>b</sup>
	MD	36,87	40,08	-	38,33	39,69	-
M. quadriceps femoris [µm]	M	37,03±8,08	34,84±9,64	0.57 <sup>b</sup>	42,10±6,19	40,06±4,80	0.40 <sup>b</sup>
	MD	37,16	37,14	-	40,85	39,86	-
M. tibialis anterior [µm]	M	38,17±10,92	30,32±10,91	<b>0.03<sup>b</sup></b>	39,42±5,25	39,21±5,00	0.73 <sup>b</sup>
	MD	42,10	34,74	-	39,45	38,80	-

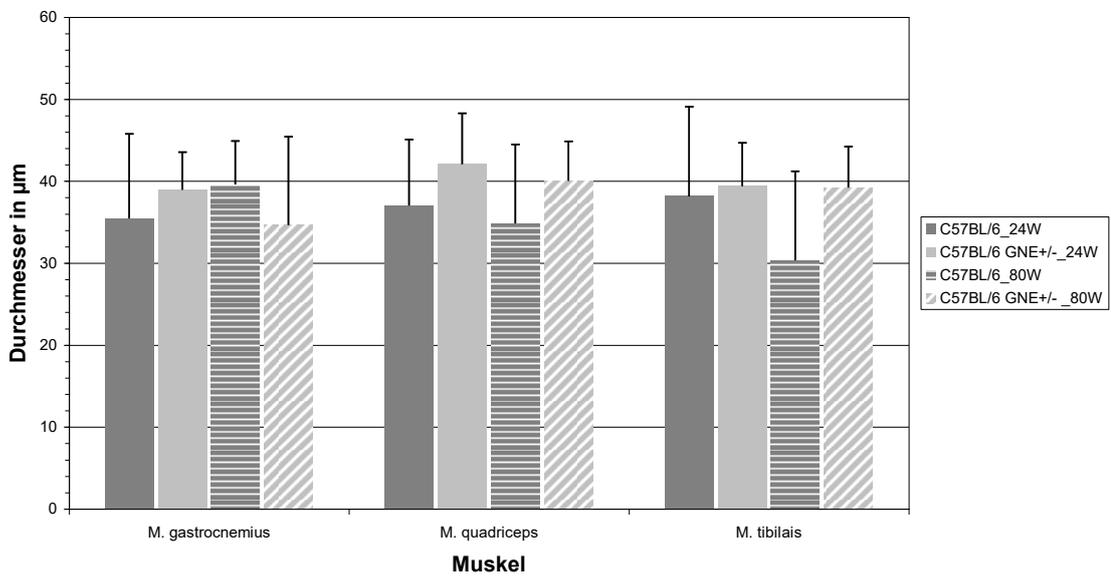
P-Wert durch <sup>a</sup> t-Test, <sup>b</sup> Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, <sup>c</sup> Welch-Test ermittelt; signifikante Werte ( $p < .05$ ) sind fett hervorgehoben; W=Wochen, m=männlich, w=weiblich, g=Gramm, mg=Milligramm, M=Mittelwert, SD=Standardabweichung, MD=Median, -=nicht erhoben.

### Typ-I-Muskelfasern



**Abb. 17:** Vergleich der Typ-I-Faserdurchmesser von *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps femoris* und *M. tibialis anterior* an 24 und 80 Wochen alten C57BL/6 und GNE+/- Mäusen

### Typ-II-Muskelfasern



**Abb. 18:** Vergleich der Typ-II-Faserdurchmesser von *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps femoris* und *M. tibialis anterior* an 24 und 80 Wochen alten C57BL/6 und GNE+/- Mäusen.

## 4.7 Häufigkeitsverteilung von binnenständigen Kernen

Die im Folgenden dargestellten Tabellen und Abbildungen geben Aufschluss über den Anteil binnenständiger Kerne innerhalb der verschiedenen Muskeln, gemessen an heterozygoten *GNE*<sup>+/-</sup> Tieren und C57BL/6 Kontrolltieren in Abhängigkeit des Alters (Tabelle 12, Tabelle 13, Abb. 19).

Zwischen den *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen und den C57BL/6 Tieren der jeweiligen Altergruppe konnte kein signifikanter Unterschied eruiert werden.

In den Mm. gastrocnemii und Mm. quadriceps femoris der Kontrollgruppe, als auch im M. gastrocnemius der *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse wurde mit zunehmendem Alter eine signifikante Erhöhung binnenständiger Kerne festgestellt, die sich sowohl an den Mittelwerten, als auch an den Medianen ablesen läßt.

**Tabelle 12:** Anteil binnenständiger Kerne von 24 und 80 Wochen alten Mäusen. Verglichen werden M. gastrocnemius, M. quadriceps und M. tibialis anterior von insgesamt 38 männlichen und weiblichen C57BL/6 und *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen.

Mausmodelle	Vergleich 24 Wochen alter C57BL/6 und <i>GNE</i> <sup>+/-</sup> Mäuse			Vergleich 80 Wochen alter C57BL/6 und <i>GNE</i> <sup>+/-</sup> Mäuse			
		C57BL/6 (24W)	<i>GNE</i> <sup>+/-</sup> (24W)	p	C57BL/6 (80W)	<i>GNE</i> <sup>+/-</sup> (80W)	p
Geschlecht [m : w]		3 : 6	5 : 2		4 : 6	5 : 7	
M. gastrocnemius [%]	M	0,64 ± 0,75	0,52 ± 0,85	0.81 <sup>b</sup>	1,83 ± 1,12	2,31 ± 1,78	0.84 <sup>b</sup>
	MD	0,52	0	-	2,20	1,80	-
M. quadriceps femoris [%]	M	1,17 ± 1,2	1,44 ± 1,7	0.79 <sup>b</sup>	3,85 ± 3,47	3,11 ± 1,98	0.80 <sup>b</sup>
	MD	1,02	0,74	-	2,80	2,79	-
M. tibialis anterior [%]	M	1,41 ± 1,19	1,13 ± 1,09	0.68 <sup>b</sup>	3,01 ± 1,73	2,35 ± 2,23	0.50 <sup>b</sup>
	MD	0,92	1,34	-	3,23	2,02	-

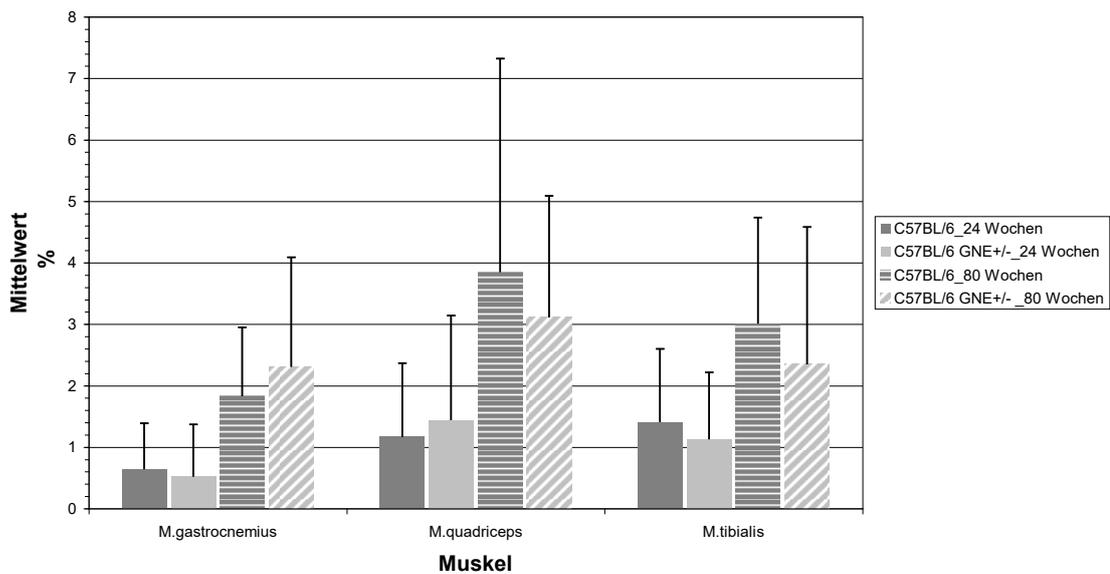
*P*-Wert durch <sup>a</sup> *t*-Test, <sup>b</sup> Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, <sup>c</sup> Welch-Test ermittelt; signifikante Werte (*p* < .05) sind fett hervorgehoben; *W*=Wochen, *m*=männlich, *w*=weiblich, *g*=Gramm, *mg*=Milligramm, *M*=Mittelwert, *SD*=Standardabweichung, *MD*=Median, -=nicht erhoben.

**Tabelle 13:** Anteil binnenständiger Kerne von 24 und 80 Wochen alten Mäusen. Verglichen werden *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps* und *M. tibialis anterior* von insgesamt 38 männlichen und weiblichen C57BL/6 und GNE+/- Mäusen.

Mausmodelle	Vergleich 24 und 80 Wochen alter C57BL/6 Mäuse			Vergleich 24 und 80 Wochen alter GNE+/- Mäuse			
	C57BL/6 (24W)	C57BL/6 (80W)	P	GNE+/- (24W)	GNE+/- (80W)	P	
Geschlecht [m : w]	3 : 6	5 : 2		4 : 6	5 : 7		
M. gastrocnemius [%]	M	0,64 ±0,75	1,83 ±1,12	<b>0.03<sup>b</sup></b>	0,52 ±0,85	2,31 ±1,78	<b>0.01<sup>b</sup></b>
	MD	0,52	2,20	-	0	1,80	-
M. quadriceps femoris [%]	M	1,17 ±1,2	3,85 ± 3,47	<b>0.02<sup>b</sup></b>	1,44 ±1,70	3,11 ± 1,98	0.08 <sup>b</sup>
	MD	1,02	2,80	-	0,74	2,79	-
M. tibialis anterior [%]	M	1,41 ± 1,19	3,01 ± 1,73	0.05 <sup>b</sup>	1,13 ±1,09	2,35 ±2,23	0.24 <sup>b</sup>
	MD	0,92	3,23	-	1,34	2,02	-

P-Wert durch <sup>a</sup> t-Test, <sup>b</sup> Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, <sup>c</sup> Welch-Test ermittelt; signifikante Werte ( $p < .05$ ) sind fett hervorgehoben; W=Wochen, m=männlich, w=weiblich, g=Gramm, mg=Milligramm, M=Mittelwert, SD=Standardabweichung, MD=Median, -=nicht erhoben.

### Binnenständige Kerne



**Abb. 19:** Anteil binnenständiger Kerne in %. Vergleich von *M. gastrocnemius*, *M. quadriceps femoris* und *M. tibialis anterior* anhand 24 und 80 Wochen alter C57BL/6 und GNE+/- Tiere.

## 4.8 Vorkommen von RVs

Anhand der Gomori-Trichrom Färbung ließen sich sowohl bei alten als auch bei jungen Tieren, bei heterozygoten Mäusen ebenso wie innerhalb der Kontrollgruppe Vakuolen beobachten (Abb. 13).

Im Vergleich der heterozygoten und homozygoten Tiere identischen Alters waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar, mit zunehmendem Alter hingegen konnten in beiden Gruppen signifikante Veränderungen der Vakuolenanzahl beobachtet werden.

Es stellte sich jedoch im Verlauf heraus, dass es sich bei den nachgewiesenen Vakuolen nicht um RVs, sondern vielmehr um Gefrierartefakte handelte, so dass eine weitere Auswertung entfiel.

#### **4.9 Weitere histologische Charakterisierungen**

Es fanden sich keinerlei pathologische Veränderungen bei 24 Wochen alten Mäusen. Mittels HE-Färbung sowie mit der Saure Phosphatase Reaktion konnten keine entzündlichen Infiltrate eruiert werden. Lobulierte Fasern, die ebenfalls typische Altersveränderungen darstellen, wurden nicht gefunden.

Die mittels COX/SDH Färbung nachweisbaren, oxidativen Veränderungen in Form von COX-negativen Fasern konnten in keiner Gruppe beobachtet werden, ebenso wenig fanden sich Nekrosen, gesplittete Muskelfasern, Fibrosen oder fettige Degenerationen.

#### **4.10 Elektronenmikroskopische Befunde**

In den von Frau Prof. Dr. G. Stoltenburg-Didinger und Herrn Prof. Dr. J. Weis ausgewerteten Ultradünnschnitten des für die Elektronenmikroskopie eingebetteten Materials konnten keine intrasarkoplasmatischen RVs dargestellt werden. Es zeigten sich allerdings sowohl bei den heterozygoten *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen als auch in der Kontrolltiergruppe der 80 Wochen alten Tiere perinukleäre Vakuolen und perinukleäre Lipofuszinakkumulationen in beiden Geschlechtern (Abb. 20 und Abb. 21).

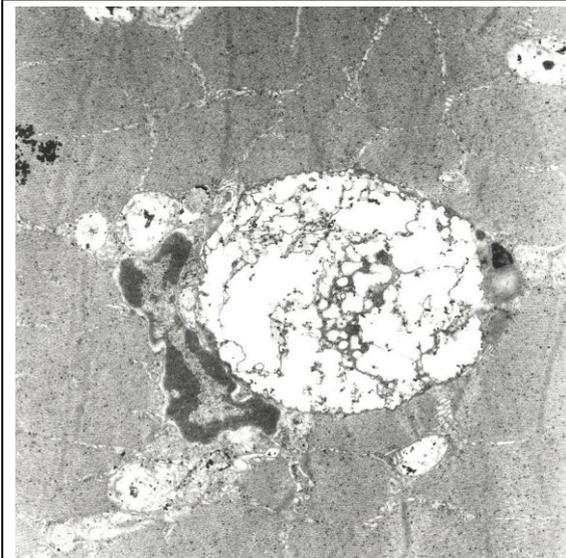
Die Vakuolen enthielten membranöse und dichte Granula, intensiv osmiophiles (Osmiumtetroxid als Kontrastmittel annehmend) Material, gelegentlich auch Lipofuszin.

In Nachbarschaft zu den größeren Vakuolen zeigten sich hin und wieder runde, von doppelwandigen Membranen begrenzte Strukturen sarkoplasmatischer Tubuli. Sie wiesen dunkle, randständige Granula auf und zeigten zentralseits Strukturen mittlerer Dichte.

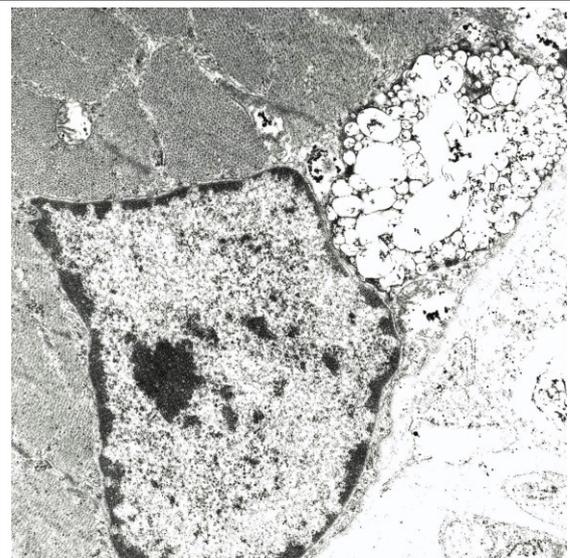
Mitochondriale Ansammlungen waren meist subsarkolemmal oder perinukleär lokalisiert, oft erkennbar in beiden Gruppen alter Mäuse. Ihre Cristastrukturen erschienen normal ohne erkennbare parakristalline Einschlüsse.

Veränderungen der Nerven oder der neuromuskulären Endplatten konnten lediglich im heterozygoten Genotyp beobachtet werden.

Zusätzlich imponierten tubuläre Aggregate lediglich in männlichen Mäusen, die ebenfalls in beiden Gruppen eruiert werden konnten.



**Abb. 20:** Elektronenmikroskopische Aufnahme des *M. quadriceps* einer 80 Wochen alten C57BL/6 Maus. Perinukleäre Vakuole, von Einzelmembran umgeben.



**Abb. 21:** Elektronenmikroskopische Aufnahme des *M. quadriceps* einer 80 Wochen alten *GNE+/-* Maus. Subsarkolemmaler Nukleus mit perinukleärer Vakuole.

#### 4.11 Messung der Sialisierung

Unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Horstkorte wurden am Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Kooperation mit der Charité (Universitätsmedizin Berlin) die Sialinsäurelevel der *GNE+/-* Mäuse und der C57BL/6 Kontrollmäuse verglichen. Bei den 24 Wochen alten *GNE+/-* Tieren zeigten sich um 33-53 % signifikant reduzierte Sialinsäurelevel, die sich im Alter angleichen und bei 80 Wochen alten *GNE+/-* Mäusen lediglich um 12-15 % reduziert waren. Somit waren die Sialinsäurewerte im Alter zwar reduziert, jedoch nicht mehr signifikant. Eine Ausnahme stellte der *M. tibialis* dar, dieser zeigte bei 80 Wochen alten *GNE+/-* Tieren einen Anstieg der Sialinsäure um 19 % (Hanisch et al., 2013).

Insgesamt wurde im Alter eine Erhöhung der Sialinsäuren im Muskel festgestellt. Bei der *GNE+/-* Maus erhöhten sich die Sialinsäurelevel um 87-207 %, bei den Kontrollmäusen um 16-46 %. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden im Anschluss die Sialinsäurelevel von je zwei C57BL/6 Mäusen im Alter von drei, sechs und neun Monaten untersucht. Auch hier konnte ein altersbedingter Anstieg der Sialinsäurelevel bestätigt werden (Hanisch et al., 2013).

## 5 Diskussion

### 1. Sind Merkmale nachweisbar, die ebenfalls bei der h-IBM2 vorkommen?

Phenotypisch fanden sich keine Unterschiede zwischen den *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen gegenüber der C57BL/6 Kontrollgruppe. Sowohl die Mortalität, als auch Körper- und Muskelgewicht wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Bei h-IBM2 Betroffenen zeigt sich eine deutliche Muskelschwäche, die insbesondere die untere Extremität betrifft (Nonaka et al., 1998; Malicdan und Nonaka, 2008; Huizing und Krasnewich, 2009; Park et al., 2012). Mittels Laufradtest konnte am Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Horstkorte bei dem *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell ebenfalls eine deutliche Leistungsminderung nachgewiesen werden (Hanisch et al., 2013).

Die CK-Werte der *GNE*<sup>+/-</sup> Tiere waren sowohl bei den 24 Wochen alten, als auch bei den 80 Wochen alten Tieren im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe erhöht, jedoch nicht signifikant erhöht. Auch bei der h-IBM2 stellen sich die CK-Werte im Serum lediglich als normal bis maximal Fünffach erhöht dar (Malicdan und Nonaka, 2008).

Histologische Veränderungen wie die Zunahme atropher Fasern, oder Fasertypenveränderungen, die beispielsweise auf eine neurogene Muskelatrophie hinweisen würden, konnten nicht beobachtet werden. Ebenso wenig waren Entzündungsinfiltrate nachweisbar. Auch in den Muskelbiopsien der h-IBM2 Betroffenen können keine Entzündungszellen nachgewiesen werden (Huizing und Krasnewich, 2009).

Die Typ-I-Muskelfasern dominieren mit zunehmendem Voranschreiten der h-IBM2 beim Menschen (Nonaka et al, 1981; Malicdan, 2008). Im *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell zeigten sich lichtmikroskopisch im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede in der Faseranzahl oder in der Durchmesserbestimmung.

Mittels Gomori-Trichrom Färbung konnten leere, teils geränderte, teils fuchsinophile Vakuolen dargestellt werden. Sie wiesen eine ähnliche Konfiguration auf wie die für die Einschlusskörpermyopathie typischen RVs (Abb. 13). Im Gegensatz zu den RVs traten diese Veränderungen jedoch nicht rundlich, sondern größtenteils schlitzförmig konfiguriert in Erscheinung. Sie konnten in Muskelfasern junger als auch alter Tiere, bei heterozygoten *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen als auch in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Allerdings konnte in der Kongorot-Färbung sowie unter polarisiertem Licht kein typischerweise in RVs vorhandenes Amyloid nachgewiesen werden. Um die ebenfalls in den RVs vorkommende Saure Phosphatase darzustellen, wurde die Saure Phosphatase Reaktion verwendet. Saure Phosphatase positive Strukturen konnten hierbei jedoch nicht gefunden werden. Zusätzlich wurden einige Muskelfasern sowohl mit dem Caveolin 3 Antikörper, zur Kennzeichnung des Sarkolemms, als

auch mit dem TDP-43 Antikörper behandelt, da auch TDP-43 in der Literatur in den Einschlüssen gefunden wurde (Hoshi et al., 2012; Llewellyn et al., 2013). Der Membranmarker Caveolin 3 konnte nicht in allen Präparaten nachgewiesen werden, TDP-43 Akkumulate waren in den Präparaten überhaupt nicht darstellbar. Histologisch und immunhistochemisch kann somit aufgrund der inkonsistenten Darstellung, der abnormen Form, dem Fehlen von Saurer Phosphatase positiven Strukturen sowie fehlender Darstellung von Vakuolenmembranen und Amyloid nicht sicher von RVs ausgegangen werden. Auch elektronenmikroskopisch fanden sich keine intrasarkoplasmatischen RVs. Die gefundenen Vakuolen entsprechen somit nicht den für die Einschlusskörpermyopathie charakteristischen RVs, sondern vielmehr möglichen Schneide- oder Gefrierartefakten.

In den unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Horstkorte durchgeführten Untersuchungen konnte bei den *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen eine deutliche, zum Teil signifikante Leistungsminderung sowie eine anfänglich signifikante, im Alter eher moderate Sialinsäurereduktion dargestellt werden (Hanisch et al., 2013). Diese Ergebnisse passen durchaus zum Verlauf der h-IBM2. Es ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Phenotyp oder CK-Wert Erhöhung feststellen, auch RVs und andere für die h-IBM2 charakteristischen histopathologischen oder elektronenmikroskopischen Veränderungen konnten im *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell nicht nachgewiesen werden. Die *Muskelfaserhypothese* ließ sich somit nicht bestätigen.

## **2. Sind diese Merkmale bei betroffenen *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen stärker ausgeprägt als bei gesunden Mäusen?**

Durch die am Institut für Physiologische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. R. Horstkorte durchgeführte Laufraduntersuchung konnte eine reduzierte Leistungsfähigkeit bei *GNE*<sup>+/-</sup> Tieren im Alter von sechs Monaten beobachtet werden. Eine signifikante Reduktion ließ sich jedoch nur bis zum vierten Versuchstag nachweisen (Hanisch et al., 2013). Da allerdings nur wenige Versuchstiere für den Laufradtest ausgewählt wurden, ist dies am ehesten auf die individuelle Besonderheit der wenigen getesteten Tiere und nicht auf ein Merkmal von *GNE*<sup>+/-</sup> Tiere im Allgemeinen zurückzuführen.

Zudem zeigten sich bei den jungen *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen signifikant reduzierte Sialinsäurelevel, die sich jedoch im Alter angleichen. Somit konnten zwar auch bei den 80 Wochen alten Mäusen reduzierte Sialinsäurelevel nachgewiesen werden, diese waren jedoch nicht mehr signifikant (Hanisch et al., 2013).

Die *Inzuchthypothese* konnte demnach nur bedingt bestätigt werden.

### 3. Gibt es altersbedingte Unterschiede?

Das Gesamtgewicht änderte sich mit zunehmendem Alter nicht, einzelne Muskeln wiesen jedoch Unterschiede auf. Die Mm. tibialis und Mm. quadriceps femoris waren in der 80 wöchigen, heterozygoten Gruppe signifikant schwerer als in der gleichaltrigen Kontrollgruppe.

Die CK wies in beiden Gruppen mit zunehmendem Alter keinen signifikanten Anstieg auf. Die CK-Werte sowohl junger als auch alter *GNE*<sup>+/-</sup> Tiere sind nicht signifikant höher als in der Kontrollgruppe, eine Übertragbarkeit ist somit nicht möglich.

Tendenziell kommt es mit zunehmendem Alter zu einer Abnahme der Durchmesser, die jedoch lediglich beim M. tibialis der Kontrollgruppe für die Typ-II-Muskelfasern signifikant erscheint. Binnenständige Kerne, die für eine Vielzahl myopathischer Erkrankungen ein unspezifisches Merkmal darstellen, steigen sowohl bei der heterozygoten *GNE*<sup>+/-</sup> Gruppe als auch bei den Kontrolltieren mit zunehmendem Alter im M. gastrocnemius signifikant an. Auch im M. quadriceps der Kontrollgruppe ist ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen. Dies sollte man jedoch aufgrund des Anstiegs in beiden Gruppen nicht als Charakteristikum für ein Modell der Einschlusskörpermyopathie, sondern vielmehr als unspezifisches Zeichen von Regenerationsprozessen im Skelettmuskel und somit als Merkmal des Alterungsprozesses werten.

Elektronenmikroskopisch waren überwiegend optisch leere Vakuolen in Kernnähe sichtbar, die sowohl in 80 Wochen alten Kontrolltieren als auch bei den 80 Wochen alten, heterozygoten *GNE*<sup>+/-</sup> Tieren eruiert wurden. Da diese in keinem der 24 Wochen alten Tiere beobachtet werden konnten und das Vorkommen der Vakuolen nicht auf die *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse beschränkt war, sollten sie als Altersveränderungen in den Muskelfasern von Mäusen angesehen werden.

Die gemessenen Sialinsäurelevel steigen sowohl bei den *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen als auch bei den Kontrolltieren mit zunehmendem Alter an, bleiben jedoch bei heterozygoten Tieren niedriger. Die Unterschiede vermindern sich im Alter, die Werte gleichen sich an (Hanisch et al., 2013). Mögliche Ursachen hierfür könnten zum einen eine erhöhte Sialisierung im Alter oder aber ein erhöhter Bedarf an Sialinsäuren sein.

Die *Altershypothese* konnte demnach nicht bestätigt werden.

### 4. Kann die *GNE*<sup>+/-</sup> Maus als Modell für die h-IBM2 fungieren?

Weder histopathologisch noch phenotypisch konnten relevante, signifikante Unterschiede nachgewiesen werden, die zu den Veränderungen der Einschlusskörpermyopathie passen würden. Es konnte jedoch eine deutlich verminderte Leistungsfähigkeit bei den heterozygoten Mäusen als auch bei betroffenen Patienten eruiert werden.

Die CK-Werte betroffener Mäuse waren erhöht, was durchaus vergleichbar ist mit den normal bis leicht erhöhten Werten bei h-IBM2 Betroffenen. Aufgrund der fehlenden Signifikanz sind die Ergebnisse jedoch nicht allgemein übertragbar.

Es ließen sich schlitzförmige Vakuolen nachweisen, allerdings konnte in der Kongorot-Färbung sowie unter polarisiertem Licht kein typischerweise in RVs vorhandenes Amyloid nachgewiesen werden. Da sich bei der h-IBM2 lediglich wenige Muskelfasern als kongophil erweisen, wurden weitere immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen vorgenommen. Sowohl in den Semidünnschnitten des für die Elektronenmikroskopie eingebetteten Materials als auch mittels Saure Phosphatase Reaktion konnten keine intrasarkoplasmatischen RVs dargestellt werden, so dass davon auszugehen ist, dass die innerhalb der Muskelfasern heterozygoter Tiere gefundenen Vakuolen lediglich Artefakte und nicht die charakteristischen RVs darstellen.

Sowohl bei *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen als auch bei betroffenen h-IBM2 Patienten sind die Sialinsäurelevel reduziert, was höchstwahrscheinlich zurückzuführen ist auf die Mutation im *GNE* Gen. Jedoch konnten durch die isolierte Mutation des *GNE* Gens nicht die charakteristischen Merkmale der h-IBM2 hervorgerufen werden. Es stellt sich somit die Frage, ob allein die *GNE* Mutation und die damit verbundene Hyposialisierung von Muskelproteinen verantwortlich ist für die Merkmale der h-IBM2, oder ob ganz andere, noch unentdeckte Pathomechanismen das Krankheitsbild prägen.

Möglicherweise stellt die Sialinsäurereduktion tatsächlich den Ursprung des Problems dar und die Hyposialisierung bewirkt eine Minderproduktion von Muskelglykoproteinen. Dies könnte dazu führen, dass die Proteinfaltung und der anschließende Transfer durch das ER und den Golgi Apparat gestört ist. Durch die fehlende Anheftung an die Plasmamembran kommt es zur Proteinrückbeförderung ins Zytoplasma und Akkumulation mit anschließendem Abbau durch das Ubiquitin-Proteasomsystem. Aufgrund des unvollständigen Abbaus von Proteinansammlungen entstehen die charakteristischen RVs. In Folge kommt es im Muskel zu Funktionseinschränkungen. Passend zu dieser Hypothese ist die erfolgreiche, prophylaktische Gabe von Sialinsäuremetaboliten, durch die der myopathische Phenotyp im Mausmodell verhindert werden konnte (Malicdan et al., 2009).

Es ist jedoch durchaus möglich, dass die Hyposialisierung der Glykoproteine lediglich ein Nebenprodukt einer anderen metabolischen Schädigung darstellt, das für die Fehlfunktion und Ausprägung der h-IBM2 verantwortlich ist (Broccolini et al., 2011).

Es sollte ausserdem berücksichtigt werden, dass die h-IBM2 sowohl homozygot als auch heterozygot vererbt werden kann und sich die Ausprägung pathologischer Merkmale unterschiedlich stark darstellt (Cho et al., 2013).

Der Nachweis pathologischer Merkmale und Charakteristika bei homozygoten Mäusen als auch der Vergleich zu homozygot betroffenen h-IBM2 Patienten ist allerdings aufgrund der frühen Letalität der Mäuse leider nicht möglich. Ein heterozygoter *GNE* Defekt führt nachweisbar zu einer moderaten Hyposialisierung, die weder phänotypisch noch histopathologisch der h-IBM2 gleicht.

Da der vollständige Pathomechanismus der h-IBM2 derzeit noch ungeklärt ist, das *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell durch die heterozygote Mutation im *GNE* Gen lediglich eine reduzierte Sialisierung und eine wahrscheinlich darauf zurückzuführende Leistungsminderung zeigt, kann es aufgrund fehlender histopathologischer und elektronenmikroskopischer Merkmale nicht als Modell für die h-IBM2 angesehen werden.

## 6 Zusammenfassung

Die *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse weisen eine insbesondere in jungen Jahren vorkommende, mit zunehmendem Alter besser kompensierbare, funktionelle Einschränkung auf, dennoch konnte mittels histologischer Untersuchungen kein Nachweis eines für die Einschlusskörpermyopathie typischen Phänotyps der C57BL/6 *GNE*<sup>+/-</sup> Maus erbracht werden. Die elektronenmikroskopisch nachweisbaren Vakuolen, die sowohl bei heterozygoten Tieren als auch bei den *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen vorkommen, ließen sich nicht als RVs identifizieren, sondern stellen vielmehr Zeichen von Alterungsprozessen im Skelettmuskel dar. Ein besonders interessantes und neues Ergebnis ist die zunehmende Sialisierung im Alter, sowohl bei der heterozygoten Gruppe als auch bei den Kontrolltieren (Hanisch et al., 2013). Die funktionelle Bedeutung ist allerdings bislang noch unklar.

Nach den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen führt eine moderate Hyposialisierung, wie im *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell nachgewiesen, nicht zwangsläufig zur Bildung von RVs oder den für die h-IBM2 charakteristischen Merkmalen. Die *Muskelfaserhypothese* und die *Altershypothese* ließen sich nicht, die *Inzuchthypothese* lediglich teilweise bestätigen, das *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell ist somit kein Modell für die h-IBM2.

## 7 Literaturverzeichnis

Alberts B: Molekularbiologie der Zelle. 4. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2004, S. 764; 861-866; 1262.

Argov Z, Yarom R (1984) "Rimmed Vacuole Myopathy" Sparing the quadriceps. A Unique Disorder in Iranian Jews. *J Neurol Sci* 64:33-43.

Arhzaouy K, Strucksberg KH, Tung SM, Tangavelou K, Stumpf M, Faix J, Schröder R, Clemen CS, Eichinger L (2012) Heteromeric p97/p97R155C complexes induce dominant negative changes in wild-type and autophagy 9-deficient Dictyostelium strains. *PLoS ONE* 7(10):e46879.

Askanas V (1993) New advances in inclusion-body myositis. *Curr Opin Rheumatol* 5:732-741.

Askanas V (1997) New developments in hereditary inclusion body myopathies. *Ann Neurol* 41(4):421-422.

Askanas V (1998) Sporadic Inclusion-Body Myositis and Hereditary Inclusion-Body Myopathies. *Neurol* 55:915-920.

Askanas V (2001) Inclusion-Body Myositis: Newest Concepts of Pathogenesis and Relation to Aging and Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:1-14.

Askanas V (2002) Inclusion-body myositis and myopathies: different etiologies, possibly similar pathogenic mechanism. *Neurol* 15:525-531.

Askanas V, Engel WK (1995) New advances in the understanding of sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 7:486-496.

Askanas V, Engel WK (2003) Unfolding Story of Inclusion-Body Myositis and Myopathies: Role of Misfolded Proteins, Amyloid- $\beta$ , Cholesterol, and Aging. *J Child Neurol* 18(3):185-190.

Askanas V, Engel WK (2008) Inclusion-body myositis: muscle-fiber molecular pathology and possible pathogenic significance of its similarity to Alzheimer's and Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 116(6):583-595.

Askanas V, Serratrice G, Engel WK: Inclusion-body myositis and myopathies. 1st edition, Cambridge University Press, Cambridge-New York, 1998, S. 6-52.

Bergmann M, Weis J, Probst-Cousin S (2009) Muskelbiopsie-Indikation und Technik. *Pathologie* 30(5):345-351.

Bianchi L, Riede UN: Allgemeine und spezielle Pathologie. 5. Auflage, Thieme, Stuttgart, 2004, S. 1116-1119; 1129-1191. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Aguzzi A: Pathologie. 3. Auflage, Urban & Fischer, München, 2004, S. 341-342.

Boellaard JW: Neuropathologie, Muskulatur, Sinnesorgane. 2. Auflage, Springer, Berlin, 1995, S. 403; 443.

Broccolini A, Ricci E, Cassandrini D, Gliubizzi C, Bruno C, Tonoli E, Silvestri G, Pescatori M, Rodolico C, Sinicropi S, Servidei S, Zara F, Minetti C, Tonali PA, Mirabella M. (2004) Novel GNE mutations in Italian families with autosomal recessive hereditary inclusion-body myopathy. *Hum Mutat* 23(6):632.

Broccolini A, Gidaro T, Morosetti R, Mirabella M (2009) Hereditary inclusion-body myopathy: clues on pathogenesis and possible therapy. *Muscle Nerve* 40(3):340-349.

Broccolini A, Gidaro T, Morosetti R, Sancricca C, Mirabella M (2011) Hereditary inclusion-body myopathy with sparing of the quadriceps: the many tiles of an incomplete puzzle. *Acta Myol* 30(2):91-95

Budini M, Buratti E, Stuani C, Guarnaccia C, Romano V, De Conti L, Baralle FE (2012) A Cellular Model of TAR DNA Binding Protein 43 (TDP-43) Aggregation Based on Its C-terminal Q/N Rich Region. *J Biol Chem* 287(10):7512-7525.

- Ching JK, Elizabeth SV, Ju JS, Lusk C, Pittman SK, Wehl CC (2012) mTOR dysfunction contributes to vacuolar pathology and weakness in valosin-containing protein associated inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 22(6):1167-1179.
- Chinnery PF, Johnson MA, Walls TJ., Gibson GJ., Fawcett PRW, Jamieson S, Fulthorpe JJ., Cullen M, Hudgson P, Bushby KMD (2001) A novel autosomal dominant distal myopathy with early respiratory failure: clinico-pathologic characteristics and exclusion of linkage to candidate genetic loci. *Ann. Neurol.* 49: 443-452.
- Cho A, Hayashi YK, Monma K, Oya Y, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I (2013) Mutation profile of the GNE gene in Japanese patients with distal myopathy with rimmed vacuoles (GNE myopathy). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (pub ahead of print).
- Darin N, Kyllerman M, Wahlstrom J, Martinsson T, Oldfors A (1998) Autosomal dominant myopathy with congenital joint contractures, ophthalmoplegia, and rimmed vacuoles. *Ann Neurol* 44:242-248.
- Dennis JW, Laferte S (1987) Tumor cell surface carbohydrate and the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* 5:185-204.
- Dubowitz V, Sewry CA: *Muscle biopsy. A Practical Approach.* 3rd. edition, Saunders/Elsevier, Philadelphia, 2007, S .21-30; 41-52; 61; 77-85; 92-94; 535-537; 551-552.
- Eger K, Jerusalem F, Zierz S: *Muskelerkrankungen.* 3. Auflage, Thieme, Stuttgart, 2003, S. 206-209.
- Eisenberg I, Avidan N, Potikha T, Hochner H, Chen M, Olender T, Barash M, Shemesh M, Sadeh M, Grabov-Nardini G, Shmylevich I, Friedmann A, Karpati G, Walter G, Bradley WG, Baumbach L, Lancet D, Ben Asher E, Beckmann JS, Argov Z, Mitrani-Rosenbaum S (2001) The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat. Genet.* 29:83-87.
- Eisenberg I, Grabov-Nardini G, Hochner H, Korner M, Sadeh M, Bertorini T, Bushby K, Castellan C, Felice K, Mendell J, Merlini L, Shilling C, Wirguin I, Argov Z, Mitrani-Rosenbaum S (2003) Mutations spectrum of GNE in hereditary inclusion body myopathy sparing the quadriceps. *Hum Mutat* 21(1):99.
- Enns GM, Seppala R, Musci TJ, Weisiger K, Ferrell LD, Wenger DA, Gahl WA, Packman S (2001) Clinical course and biochemistry of sialuria. *J Inherit Metab Dis.* 24(3):328-336.
- Fischer C, Kleinschnitz K, Wrede A, Muth I, Kruse N, Nishino I, Schmidt J (2013) Cell stress molecules in the skeletal muscle of GNE myopathy. *BMC Neurol* 13 (24):<http://www.biomedcentral.com/1471-2377/13/24>.
- Galeano B, Klootwijk R, Manoli I, Sun M, Ciccone C, Darvish D, Starost MF, Zerfas PM, Hoffmann VJ, Hoogstraten-Miller S, Krasnewich DM, Gahl WA, Huizing M. (2007) Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by N-acetylmannosamine. *J Clin Invest* 117(6):1585-1594.
- Gagiannis D, Orthmann A, Danssmann I, Schwarzkopf M, Weidemann W, Horstkorte R (2007) Reduced sialisation status in UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosaminekinase (GNE)-deficient mice. *Glycoconj J* 24(2-3):125-130.
- Goebel HH, Fardeau M (2004) 121st ENMC International Workshop on Desmin and Protein Aggregate Myopathies. *Neuromuscul Disord* 14:767-773.
- Graw J (2007): Nobelpreis 2007 in Medizin: Herstellung von knockout-Mäusen. *Biuz* 37(6):352-354.
- Hanisch F, Weidemann W, Mona Großmann M, Joshi PR, Holzhausen HJ, Stoltenburg G, Weis J, Stephan Zierz S, Horstkorte R (2013) Sialylation and Muscle Performance: Sialic Acid Is a Marker of Muscle Ageing. *PLoS ONE* 8(12):e80520.

- Hilton-Jones D, Miller A, Parton M, Holton J, Sewry C, Hanna MG (2010) Inclusion body myositis. MRC Centre for Neuromuscular Diseases, IBM workshop, London, 13 June 2008. *Neuromuscul Disord* 20:142-147.
- Hoshi A, Yamamoto T, Kikuchi S, Soeda T, Shimizu K, Ugawa Y (2012) Aquaporin-4 expression in distal myopathy with rimmed vacuoles. *BMC Neurol* 12(22):<http://www.biomedcentral.com/1471-2377/12/22>.
- Horstkorte R, Nöhling S, Wiechens N, Schwarzkopf M, Danker K, Reutter W, Lucka L (1999) Tissue expression and amino acid sequence of murine UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *Eur J Biochem* 260:923-927.
- Huizing M, Krasnewich DM (2009) Hereditary Inclusion Body Myopathy: A decade of progress. *Biochim Biophys Acta* 1792(9):881-887.
- Ikeuchi T, Asaka T, Saito M, Tanaka H, Higuchi S, Tanaka K, Saida K, Uyama E, Mizusawa H, Fukuhara N, Nonaka I, Takamori M, Tsuji S (1997) Gene locus for autosomal recessive distal myopathy with rimmed vacuoles maps to chromosome 9. *Ann Neurol* 41:432-437.
- Jansson M, Darin N, Kyllerman M, Martinsson T, Wahlström J, Oldfors A (2000) Multiple mitochondrial DNA deletions in hereditary inclusion body myopathy. *Acta Neuropathol* 100:23-28.
- Jay CM, Levonyak N, Nemunaitis G, Maples PB, Nemunaitis J (2009) Hereditary Inclusion Body Myopathy (HIBM2). *Gene Regul Syst Bio* 3:181-190.
- Kim BJ, Ki CS, Kim JW, Sung DH, Choi YC, Kim SH (2005) Mutation analysis of the GNE gene in Korean patients with distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Hum Genet* 51:137-140.
- Knop KC (2006) Myopathologische Färbungen.
- Krause S, Hinderlich S, Amsili S, Horstkorte R, Wiendl H, Argov Z, Mitrani-Rosenbaum S, Lochmüller H (2005) Localization of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc kinase (GNE) in the Golgi complex and the nucleus of mammalian cells. *Exp Cell Res* 304(2):365-379.
- Kumamoto T, Ueyama H, Watanabe S, Kominami E, Ando M (1994) Muscle fiber degradation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *Acta Neuropathol* 87:143-148.
- Kumamoto T, Fujimoto S, Nagao SI, Masuda T, Sugihara R, Ueyama H, Tsuda T (1998) Proteasomes in distal myopathy with rimmed vacuoles. *Intern Med* 37:746-752.
- Leroy JG (2004) Sialuria. *Gene Reviews*.
- Li H, Chen Q, Liu F, Zhang X, Li W, Liu S, Zhao Y, Gong Y, Yan C (2013) Unfolded protein response and activated degradative pathways regulation in GNE myopathy. *PLoS ONE* 8(3):e58116.
- Liewluck T, Pho-Iam T, Limwongse C, Thongnoppakhun W, Boonyapisit K, Raksadawan N, Murayama K, Hayashi YK, Nishino I, Sangruchi T (2006) Mutation analysis of the GNE gene in distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) patients in Thailand. *Muscle Nerve* 34:775-778.
- Llewellyn KJ, Nalbandian A, Jung KM, Nguyen C, Avanesian A, Mozaffar T, Piomelli D, Kimonis VE (2013) Lipid-enriched diet rescues lethality and slows down progression in a murine model of VCP-associated disease. *Hum Mol Genet* (epub ahead of print).
- Lloyd TE (2010) Novel therapeutic approaches for inclusion body myositis. *Curr Opin Rheumatol* 22(6):658-664.
- Lu Y, Li X, Wang M, Li X, Zhang F, Li Y, Zhang M, Da Y, Yu J, Jia J (2012) A novel autosomal dominant inclusion body myopathy linked to 7q22.1-31.1. *PLoS ONE* 7(6):e39288.

- Malicdan MC, Noguchi S, Nishino I (2007) Perspectives on distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy: contributions from an animal model. Lack of sialic acid, a central determinant in sugar chains, causes myopathy? *Acta Myol* 26(3):171-175.
- Malicdan MC, Nonaka I (2008) Distal myopathies a review: Highlights on distal myopathies with rimmed vacuoles. *Neurol India* 56(3):314-324.
- Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I (2009) Prophylactic treatments with sialic acid metabolites precludes the development of the myopathic phenotype in the DMRV- hIBM mouse model. *Nat Med* 15:690-695.
- Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I (2008) Muscle weakness correlates with muscle atrophy and precedes the development of inclusion body or rimmed vacuoles in the mouse model of DMRV/hIBM. *Physiol. Genomics* 35(1):106-115.
- Malicdan MC, Noguchi S, Nishino I (2007) Autophagy in a Mouse Model of Distal Myopathy with Rimmed vacuoles or Hereditary Inclusion Body Myopathy. *Hum Mol Genet* 16:396-398.
- Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I (2007) A Gne knockout mouse expressing human GNE D176V mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 16(22):2669-2682.
- Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I (2007) A Gne knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 16(2):115-128.
- Martinsson T, Oldfors A, Darin N, Berg K, Tajsharghi H, Kyllerman M, Wahlström J (2000) Autosomal dominant myopathy: Missense mutation (Glu-706 3 Lys) in the myosin heavy chain IIa gene. *PNAS* 97(26):14514-14619.
- Mata JF, Lopes T, Gardner R, Jansen LE (2012) A rapid FACS-based strategy to isolate human gene knockin and knockout clones. *PloS ONE* 7(2):e32646.
- Matrosovich M, Klenk HD (2003) Natural and synthetic sialic acid-containing inhibitors of influenza virus receptor binding. *Rev Med Virol* 13(2):85-97.
- Mitrani-Rosenbaum S, Argov Z, Blumenfeld A, Seidman CE, Seidman JG (1996) Hereditary inclusion body myopathy maps to chromosome 9p1-q1. *Hum Mol Genet* 5(1):159-163.
- Murakami N, Ihara Y, Nonaka I (1995) Muscle fiber degeneration in distal myopathy with rimmed vacuole formation. *Acta Neuropathol* 89:29-34.
- Nakamori M, Takahashi T, Nishikawa T, Yamazaki Y, Kurashige T, Maruyama H, Arihiro K, Matsumoto M (2013) Molecular Markers for Granulovacuolar Degeneration are present in Rimmed Vacuoles. *PLoS ONE* 8(11):e80995.
- Nalbandian A, Llewellyn KJ, Kitazawa M, Yin HZ, Badadani M, Khanlou N, Edwards R, Nguyen C, Mukherjee J, Mozaffar T, Watts G, Weiss J, Kimonis VE (2012) The homozygote VCP(R155H/R155H) mouse model exhibits accelerated human VCP-associated disease pathology. *PLoS ONE* 7(9):e46308.
- Nonaka I, Sunohara N, Ishiura S, Satoyoshi E (1981) Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar (myeloid) body formation. *J Neurol Sci* 51(1):141-55.
- Nonaka I, Murakami N, Suzuki Y, Kawai M (1998) Distal myopathy with rimmed vacuoles. *Neuromuscul Disord* 8:333-337.
- Nemunaitis G, Jay CM, Maples PB, Gahl WA, Huizing M, Yardeni T, Tong AW, Phadke AP, Pappen BO, Bedell C, Allen H, Hernandez C, Templeton NS, Kuhn J, Senzer N, Nemunaitis J (2011) Hereditary Inclusion Body Myopathy: Single Patient Response to Intravenous Dosing of GNE Gene Lipoplex. *Hum Gene Ther* 22:1-11.
- Nishino I, Noguchi S (2012) Sialic acid supplementation therapy for distal myopathy with rimmed vacuoles (GNE myopathy). *Rinsho Shinkeigaku* 52(11):1210-1212.

- Ockleford CD, Cairns H, Rowe AJ, Byrne S, Scott JJA, Willingale R (2002) The distribution of caveolin-3 immunofluorescence in skeletal muscle fibre membrane defined by dual channel confocal laser scanning microscopy, fast Fourier transform and image modelling. *J Microsc* 206(2):93-105.
- Park YE, Kim HS, Choi ES, Shin JH, Kim SY, Son EH, Lee CH, Kim DS (2012) Limb-girdle phenotype is frequent in patients with myopathy associated with GNE mutations. *J Neurol Sci* 321:77-81.
- Pavelka M, Roth J: Funktionelle Ultrastruktur. Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben. 1. Auflage, Springer, Wien, 2005, S. 22; 96; 114.
- Penner J, Mantey LR, Elgavish S, Ghaderi D, Cirak S, Berger M, Krause S, Lucka L, Voit T, Mitrani-Rosenbaum S, Hinderlich S (2006) Influence of UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase Mutant Proteins on Hereditary Inclusion Body Myopathy. *Biochem* 45(9):2968-2977.
- Rappas M, Niwa H, Zhang X (2004) Mechanisms of ATPases--a multi-disciplinary approach. *Curr Protein Pept Sci* 5(2):89-105.
- Reinke SO, Eidenschink C, Jay CM, Hinderlich S (2009) Biochemical characterization of human and murine isoforms of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE). *Glycoconj J* 26(4):415-422.
- Reinke SO, Hinderlich S (2007) Prediction of three different isoforms of the human UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *FEBS Lett* 581(17):3327-3331.
- Robbins SL, Kumar V, Cotran RS: Pathologic Basis of Disease. 8th edition, Saunders/Elsevier, Philadelphia, 2010, S. 1273-1274.
- Romeis B: Mikroskopische Technik. 18. Auflage, Urban und Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 2008, S. 214-215; 235; 288; 329.
- Salama I, Hinderlich S, Shlomai Z, Eisenberg I, Krause S, Yarema K, Argov Z, Lochmuller H, Reutter W, Dabby R, Sadeh M, Ben-Bassat H, Mitrani-Rosenbaum S (2005) No overall hyposialylation in hereditary inclusion body myopathy myoblasts carrying the homozygous M712T GNE mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 328(1):221-6.
- Sandri M, Coletto L, Grumati P, Bonaldo P (2013) Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *J Cell Sci* 126(23):5325-33.
- Schwarzkopf M, Knobeloch KP, Rohde E, Hinderlich S, Wiechens N, Lucka L, Horak I, Reutter W, Horstkorte R (2002) Sialylation is essential for early development in mice. *PNAS* 99(8):5267-5270.
- Sela I, Milman Krentsis I, Shlomai Z, Sadeh M, Dabby R, Argov Z, Ben-Bassat H, Mitrani-Rosenbaum S (2011) The proteomic profile of hereditary inclusion body myopathy. *PLoS ONE* 6(1):e16334.
- Seppala R, Lehto VP, Gahl WA (1999) Mutations in the Human UDP-N-Acetylglucosamine 2-Epimerase Gene Define the Disease Sialuria and the Allosteric Site of the Enzyme, *Am J Hum Genet* 16:1563-1569.
- Sparks S, Rakocevic G, Galen J, Manoli I, Shrader J, Harris-Love M, Sonies B, Ciccone C, Dorward H, Krasnewich D, Huizing M, Dalakas MC, Gahl WA (2007) Intravenous immune globulin in hereditary inclusion body myopathy: a pilot study. *BMC Neurol* 7(3):1-13.
- Stäsche R, Hinderlich S, Weise C, Effertz K, Lucka L, Moormann P, Reutter W (1997) A Bifunctional Enzyme Catalyzes the First Two Steps in N-Acetylneuraminic Acid Biosynthesis of Rat Liver. Molecular cloning and functional expression of UDP-N-Acetyl-Glucosamine 2-Epimerase/ N-Acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* 272(39):24319-24324.

- Sunohara N, Nonaka I, Kamei N, Satojoshi E (1989) Distal Myopathy with Rimmed Vacuole Formation. *Brain* 112:65-83.
- Tal-Goldberg T, Lorain S, Mitrani-Rosenbaum S (2013) Correction of the Middle Eastern M712T Mutation Causing GNE Myopathy by Trans-Splicing. *Neuromolecular Med* (epub ahead of print).
- Udd B (2009) 165th ENMC International Workshop: distal myopathies 6-8th February 2009 Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 19(6):429-438.
- Vestweber D, Blanks JE (1999) Mechanisms That Regulate the Function of the Selectins and Their Ligands. *Physiol Rev* 79(1):181-213.
- Vladutiu GD, Idiculla S (1997) Association between internalized nuclei and mitochondrial enzyme defects in muscle. *Muscle Nerve* 20:760-763.
- Weidemann W, Klukas C, Klein Andreas, Simm A, Schreiber F, Horstkorte R (2010) Lessons from GNE-deficient embryonic stem cells: sialic acid biosynthesis is involved in proliferation and gene expression. *Glycobiol* 20(1):107-117.
- Weihl CC, Temiz P, Miller SE, Watts G, Smith C, Forman M, Hanson PI, Kimonis V, Pestronk A (2008) TDP-43 accumulation in inclusion body myopathy muscle suggests a common pathogenic mechanism with frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 79(10):1186-1189.
- Yardeni T, Choekyi T, Jacobs K, Ciccone C, Patzel K, Anikster Y, Gahl WA, Kurochkina N, Huizing M (2011) Identification, tissue distribution, and molecular modeling of novel human isoforms of the key enzyme in sialic acid synthesis, UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase. *Biochem* 50(41):8914-8925.

## 8 Thesen

1. Die heterozygoten *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse zeigten im Vergleich zu den C57BL/6 Kontrollmäusen keine phänotypischen Unterschiede.
2. Die heterozygoten, 80 Wochen alten Mäuse zeigten im Vergleich zu den C57BL/6 Kontrollmäusen ein signifikant höheres Gewicht der Mm. quadriceps femoris sowie der Mm. tibiales anteriores.
3. Die CK-Werte der *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse waren bei den jungen und alten *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe erhöht.
4. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Typ-I-Muskelfasern zwischen *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen und C57BL/6 Kontrollmäusen beobachtet werden.
5. Bei der *GNE*<sup>+/-</sup> Maus und auch bei der C57BL/6 Kontrollmaus wurde mit zunehmendem Alter eine signifikante Erhöhung binnenständiger Kerne festgestellt.
6. Die RVs konnten weder histopathologisch noch elektronenmikroskopisch bei *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen nachgewiesen werden.
7. Ultrastrukturell zeigten sich sowohl bei den alten *GNE*<sup>+/-</sup> Mäusen als auch bei den alten C57BL/6 Kontrollmäusen perinukleäre Vakuolen und perinukleäre Lipofuszinakkumulationen.
8. Das *GNE*<sup>+/-</sup> Mausmodell kann nicht als Modell für die Einschlusskörpermyopathie Typ 2 (h-IBM2) angesehen werden.

# Lebenslauf

## PERSÖNLICHE DATEN

**Name** Mona Großmann  
**Geburtsdatum** 31.08.1980  
**Geburtsort** Oranienburg  
**Staatsangehörigkeit** deutsch  
**Anschrift** Fohlenweide 35b, 16767 Leegebruch  
**Tel. Mobil** 0163/7739430  
**E- Mail** mona.grossmann@yahoo.de

## BERUFLICHE TÄTIGKEIT

**10/2011-12/2012** Weiterbildungsassistentin für Dermatologie und Allergologie in der Praxis Dres. Dörzapf und Kollegen, Augsburg  
**1/2013-12/2013** Weiterbildungsassistentin für Dermatologie und Allergologie in der Praxis Dres. Hagspiel und Fischer, Landsberg am Lech

## PUBLIKATION

**12/2013** Hanisch F, Weidemann W, Mona Großmann M, Joshi PR, Holzhausen HJ, Stoltenburg G, Weis J, Stephan Zierz S, Horstkorte R (2013) Sialylation and Muscle Performance: Sialic Acid Is a Marker of Muscle Ageing. PLoS ONE 8(12):e80520.

## STUDIUM

**05/2011** Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
**02/2007** Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
**10/2003- 5/2011** Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## PRAKTISCHES JAHR

**10/2010** Innere Medizin Städtisches Krankenhaus Dessau  
**06/2010** Chirurgie Kantonsspital St. Gallen, Schweiz  
**02/2010** Orthopädie Spital Oberwallis, Brig, Schweiz

## **FAMULATUREN**

<b>08/2009</b>	Neurologie – Klinikum Harlaching, München
<b>03/2009</b>	Orthopädie – Praxis Dr. W. Fechner, Oranienburg
<b>09/2008</b>	Dermatologie – Vivantes Krankenhaus, Berlin Spandau
<b>03/2008</b>	Orthopädie – Landeskrankenhaus Feldkirch, Österreich
<b>08/2007</b>	Innere Medizin – Oberhavel Klinik, Oranienburg

## **AUSBILDUNG**

<b>2003</b>	Ausbildung zur Grafikdesignerin an der Grafik und Design Schule Anklam
-------------	---

## **SCHULAUSBILDUNG**

<b>1998-00</b>	Abitur am F.-F.-Runge Gymnasium Oranienburg
<b>1997-98</b>	Highschool Year mit Abschluss in Washington State (USA)

## **SPRACHKENNTNISSE**

<b>Deutsch</b>	Muttersprache
<b>Englisch</b>	fließend in Wort und Schrift
<b>Französisch</b>	Grundkenntnisse
<b>Spanisch</b>	Grundkenntnisse

München, den 26.12.2013

Mona Großmann

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Die C57BL/6 *GNE*<sup>+/-</sup> Maus als Modell für die hereditäre Einschlusskörpermyopathie (h-IBM2)“ selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter sowie ohne Verwendung anderer als hier angegebener Hilfsmittel angefertigt habe.

München, den 26.12.2013

Mona Großmann

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass ich außer der vorliegenden Arbeit keine weiteren Promotionsversuche durchgeführt habe.

München, den 26.12.2013

Mona Großmann

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit „Die C57BL/6 *GNE*<sup>+/-</sup> Maus als Modell für die hereditäre Einschlusskörpermyopathie (h-IBM2)“ entstand an der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) unter der Leitung von Prof. Dr. med. S. Zierz, dem ich für die Überlassung des Themas danke.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. F. Hanisch, dem ich für die Betreuung und Begleitung bei der Auseinandersetzung mit der Thematik danke sowie Frau Prof. Dr. G. Stoltenburg-Didinger, die mich stets hochmotiviert vorantrieb und mit besonderem Engagement die elektronenmikroskopischen Untersuchungen durchführte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Horstkorte für die zur Verfügung gestellten *GNE*<sup>+/-</sup> Mäuse und Daten der Laufraduntersuchungen, als auch der Sialinsäurewerte, für die Unterstützung beim Töten der Tiere und die biochemischen Erläuterungen zur Thematik.

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. Weis für die elektronenmikroskopische Untersuchung.

Weiterhin danke ich dem gesamten Team des Muskellabors der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Halle (Saale), insbesondere Frau K. Zietz für die Hilfe beim Umgang mit dem Mikrotom, die Einführung und Begleitung beim Färben der einzelnen Muskeln und der freundlichen Hilfe bei aufgetretenen Fragen und Problemen.

Ich danke Frau Dipl. soz. N. Kastirke für die schnelle und zu jeder Tageszeit mögliche Beratung bei statistischen Problemen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die nie den Glauben an mich verliert und Simon, meinem Freund, der mich in der „heißen Phase“ ertragen musste.