

Aus der Abteilung Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Liposomal verkapselte Glukokortikosteroide in der Therapie der mdx-Maus als
Modell der Duchenne'schen Muskeldystrophie

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Charlotte Helene Elisabeth Weller
aus Tübingen

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: PD Dr. med. J. Schmidt

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Reichardt

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Hanisch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Die Muskeldystrophie Typ Duchenne.....	4
1.2. Das Tiermodell: mdx-Maus	5
1.3. Glukokortikosteroide.....	7
1.4. Liposomale Glukokortikosteroide	8
1.5. Klinische und pathologische Verlaufsparemeter	10
1.6. Expression von Entzündungsmediatoren.....	10
1.6.1. <i>Transforming growth factor β</i> (TGF β).....	10
1.6.2. <i>Secreted phosphoprotein 1</i> (spp1).....	11
1.6.3. <i>Monocyte chemoattractant protein 1</i> (MCP1)	11
1.7. Ziel dieser Arbeit.....	11
2. Material und Methoden.....	13
2.1. Tiere	13
2.2. Therapieschema.....	13
2.3. Laufrad	13
2.4. Kraftmessung	14
2.5. Gewebeaufbereitung	14
2.6. Histologie und Immunhistochemie	15
2.7. Auswertung der Gewebeschnitte	15
2.8. RNA-Aufreinigung und cDNA-Synthese.....	16
2.9. Quantitative PCR.....	16
2.10. Statistik.....	17
3. Ergebnisse.....	18
3.1. mdx-krankte Mäuse zeigen herabgesetzte Laufleistung.....	18
3.2. Laufradtraining zeigt keine Auswirkungen auf den dystrophischen Umbau	18
3.3. Behandlung mit 1mg/kg PL vs. 10mg/kg Prednisolon alle 3 Tage vs. Kontrolle.....	21
3.4. Behandlung mit 1mg/kg PL jeden 2. Tag vs. 1mg/kg Prednisolon täglich vs. Kontrolle	24
4. Diskussion	28
5. Zusammenfassung	34
6. Literaturverzeichnis	35

1. Einleitung

1.1. Die Muskeldystrophie Typ Duchenne

Die Muskeldystrophie Typ Duchenne (auch Duchenne'sche Muskeldystrophie, DMD) ist die häufigste muskuläre Erbkrankheit im Kindesalter; sie wurde von Guillaume-Benjamin Duchenne bereits im 19. Jahrhundert in Paris beschrieben (Emery 2002). Bei X-chromosomaler Vererbung betrifft sie eines von 3500 männlichen Neugeborenen. Ursächlich liegt der DMD eine Mutation im Dystrophin-Gen zugrunde (Hoffman et al. 1992). Dieses liegt in der Region Xp21.1 und ist mit 2,4 Megabasen eines der größten humanen Gene. Das Genprodukt Dystrophin ist Teil des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes, der das Aktin-Zytoskelett der Muskelzelle mit dem Sarkolemm und der extrazellulären Matrix verknüpft und damit essentieller Bestandteil der funktionsfähigen Muskelfaser ist (Matsumura et al. 1993). Mutationen im Dystrophin-Gen sind zu 1/3 der Fälle sporadische Neumutationen und nur zu 2/3 vererbt. Es liegen am häufigsten Deletionen (60-70%), seltener Duplikationen (5-10%) oder Punktmutationen (ca. 30%) vor. Mutationen, die eine Verschiebung im Leseraster (*frameshift*) verursachen, führen praktisch zu einem vollständigen Verlust des Proteins und damit zu einem wesentlich schwereren Phänotyp, als solche, bei denen der Leseraster erhalten bleibt (*inframe*). Bei 98% der DMD-Patienten findet sich eine *frameshift* Mutation, während *inframe*-Mutationen in der Regel bei der Muskeldystrophie Typ Becker zu finden sind, die seltener ist als die DMD und durch das Vorhandensein eines Restproteins wesentlich milder verläuft (Koenig et al. 1989).

Der Dystrophinmangel führt durch mechanischen Verschleiß der unzureichend verankerten Muskelfaserbestandteile zunächst fokal zu nekrotischen Veränderungen und Hypertrophie von einzelnen Muskelfasern. Im weiteren Verlauf erschöpfen rezidivierende degenerative Schübe die regenerative Kapazität und es kommt zu progredienter Degeneration von Skelett- und Herzmuskulatur mit lokaler Entzündung und fibrotischem Umbau (Deconinck und Dan 2007). Die genaue Pathogenese dieses Umbauprozesses ist jedoch derzeit noch unbekannt.

Die betroffenen Kinder fallen ab dem 3. bis 5. Lebensjahr durch eine proximal- und beinbetonte Muskelschwäche mit Stürzen und pendelndem Gangbild auf. Durch eine Schwäche der Hüft- und Kniestrecker kommt es zum charakteristischen Gowers-Zeichen („an sich empor klettern“). Durch Pseudohypertrophie der Wadenmuskulatur entstehen so genannte Gnomen-Waden. Zwischen dem 10. und 12. Lebensjahr erleiden die Patienten meist einen endgültigen Gehverlust. Häufig besteht neben der motorischen auch eine mentale Entwicklungsstörung. In 20% kommt es zu manifester mentaler Retardierung, der durchschnittliche IQ der Betroffenen liegt etwa eine Standardabweichung unterhalb des Normalbereiches. Die mentale Symptomatik ist nicht progredient. Mit der Rollstuhlpflichtigkeit kann es zu Muskelkontrakturen und progredienter Skoliose kommen. Im zweiten Lebensjahrzehnt dominiert eine progrediente Ventilationsstörung durch Affektion der Atemmuskulatur das klinische Bild. Es kommt zu Dyspnoe und rezidivierenden bronchopulmonalen Infektionen, die eine häufige Todesursache darstellen (Engel 2004). Die Lebenserwartung der Patienten beträgt je nach Verlauf bis zu 40 Jahre, bleibt zumeist jedoch deutlich darunter.

1.2. Das Tiermodell: mdx-Maus

Ein etabliertes und international anerkanntes Tiermodell der DMD ist die mdx-Maus (*muscular dystrophy x*). Sie wurde 1984 als Spontanmutation in einem C57BL/10ScSN Stamm entdeckt (Bulfield et al. 1984) und trägt eine Mutation im Maus-Homolog des humanen Dystrophin-Gens, das ebenfalls auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Erste Dystrophiezeichen treten bei der mdx-Maus relativ rasch um die 3. Lebenswoche auf. Es kommt zu histopathologischen Veränderungen an der Skelettmuskulatur mit Nekrosen, Fibrosierungen und entzündlichen Infiltraten sowie erhöhten Serum-Spiegeln der Creatin-Kinase (CK). Die Pathologie ist zwischen der 4. und 8. Lebenswoche mit Abstand am stärksten ausgeprägt, nimmt im Verlauf des ersten Lebensjahres wieder ab und bleibt dann auf vergleichsweise mildem Niveau bestehen (Muntoni et al. 1993). Insgesamt sind die Funktionseinschränkungen der Muskulatur zwar klinisch fassbar, aber zu keinem Zeitpunkt schwerwiegend. Auch die Lebenserwartung der Mäuse ist nahezu normal. Damit zeigt die mdx-Maus im Gegensatz zur DMD trotz

identischer Ätiologie einen wesentlich milderen Phänotyp (Torres und Duchon 1987). Die genauen Gründe für die unterschiedliche Ausprägung von Muskeldystrophien in verschiedenen Spezies sind nicht geklärt. Ein Erklärungsansatz ergibt sich aus der unterschiedlichen Muskelbeanspruchung von Mäusen und Menschen. Wie schon erwähnt kommt es bei Muskeldystrophien, unter anderem durch die fehlende Verankerung des Zytoskeletts am Sarkolemm, zu Membranschäden, die einen großen Teil des Muskelschadens verursachen (Petrof et al. 1993). Das Ausmaß dieses Schadens wächst damit proportional zur statischen und mechanischen Muskelbeanspruchung. Durch die vierbeinige Körperhaltung, die das Gesamtgewicht besser verteilt als die aufrechte Haltung des Menschen, hat die Maus günstigere Belastungsverhältnisse. Hinzu kommt, dass die mechanische Beanspruchung durch die Käfighaltung im Sinne eines „Laborartefaktes“ zusätzlich reduziert wird. Neben dieser naheliegenden sterischen Funktion spielt der Dystrophin-Glykoprotein-Komplex offenbar auch eine Rolle in Signal-Transduktions-Kaskaden intrazellulärer Regulationsmechanismen (Rando 2001). Die unterschiedliche Beeinträchtigung dieser Funktion könnte über sekundäre Schädigungsmechanismen für die interspezifische Phänotypenvariation mitverantwortlich sein.

Diese Unterschiede im Vergleich zur Erkrankung beim Menschen limitieren die Anwendbarkeit der mdx-Maus als DMD-Modell. Da kein alternativer international etablierter Modellorganismus zur Verfügung steht, hat man verschiedene Strategien entwickelt, um den Phänotyp der mdx-Maus dem der DMD anzugleichen. So konnte gezeigt werden, dass regelmäßige Beanspruchung der Muskulatur, zum Beispiel in Form von freiwilligem Rennen in einem Laufrad, die Muskelpathologie verstärkt (Okano et al. 2005). Diese Beobachtung bestätigt die oben erwähnte ‚Laborartefakt‘-Hypothese und hat zur Folge, dass eine Verschlechterung des Phänotyps zum Beispiel durch Laufen im Laufrad oft angestrebt wird (Grounds et al. 2008). Dieses erscheint insbesondere wichtig, um Unterschiede zwischen verschiedenen Behandlungsgruppen besser detektieren zu können. Weiterhin ist bekannt, dass das Zwerchfell im Gegensatz zu Extremitätenmuskeln eine wesentlich ausgeprägtere und der DMD ähnelichere Pathologie aufweist (Stedman et al. 1991). Daraufhin hat es sich bewährt, neben einem Beinmuskel, wie dem

Soleus, M. tibialis anterior oder M. gastrocnemius, auch das Zwerchfell histopathologisch aufzuarbeiten.

1.3. Glukokortikosteroide

Die einzige kurative Behandlung der DMD wäre ein Ersatz des fehlenden Proteins durch Gentherapie. Trotz viel-versprechender Ansätze steht diese jedoch noch nicht zur Verfügung. Daher stehen symptomatische Therapieoptionen und die Prävention sekundärer Erkrankungen derzeit im Vordergrund. Intensive physiotherapeutische Betreuung sowie Atemtherapie und operative Behebung von Kontrakturen stehen hier im Vordergrund. Die einzige derzeit etablierte medikamentöse Langzeitbehandlung ist eine immunsuppressive Therapie mit Glukokortikosteroiden (GS), wobei deren genauer Wirkmechanismus in der Skelettmuskulatur bisher ungeklärt ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine Prednisolon-Therapie sowohl bei der DMD (Kissel et al. 1991) als auch in der mdx-Maus (Wehling-Henricks et al. 2004) die Anzahl der infiltrierten Immunzellen im Muskel reduziert. Andererseits blieben Therapieerfolge durch Prednisolon unbeeinflusst durch die Paarung von mdx-Mäusen mit T- und B-Zell-defizienten (RAG2 $-/-$) Mäusen (Golumbek et al. 2007), was für eine immunzellunabhängige GS-Wirkungsweise spricht. Auch direkte Wirkungen von Prednisolon auf die Muskelzellen und deren regeneratives Potential wurden in vivo (Anderson et al. 2000) und in vitro (Metzinger et al. 1993) beobachtet. In randomisierten Doppelblindstudien konnte durch tägliche Gabe von Prednisolon oder Deflazakort ein Zuwachs an Muskelkraft und Funktion über einen Zeitraum von 6 Monaten bis 2 Jahren erzielt werden (Griggs et al. 1991). In einigen Studien konnte zusätzlich eine Verzögerung des Gehverlustes gezeigt werden (Angelini et al. 1994). Bezüglich der Dosierung und des Intervalls besteht derzeit kein Konsensus. Von den meisten Autoren wird eine tägliche Gabe von 0,75mg/kg Körpergewicht Prednisolon oder Deflazakort empfohlen.

Die Studienlage zur GS-Behandlung von mdx-Mäusen ist hingegen sehr heterogen. Einige Arbeitsgruppen beschreiben deutliche therapeutische GS-Effekte sowohl auf klinischer als auch auf histopathologischer Ebene (Archer et al. 2006; Keeling et al. 2007; Wehling-Henricks et al. 2004). Fisher et al. fanden Auswirkungen einer Prednisolon-Behandlung auf die Expressionsprofile

verschiedener Gene wie zum Beispiel Delta-Sarkoglykan oder Myosin V, jedoch blieb der dystrophische Umbau und die Entzündung des Muskels unbeeinflusst (Fisher et al. 2005). Anderson et al. beobachteten durch Deflazakort, nicht jedoch durch Prednisolon, eine therapeutische Wirkung (Anderson et al. 1996) und in einigen Studien konnte kein deutlicher Therapieeffekt demonstriert werden (Weller et al. 1991; Yang et al. 1998).

1.4. Liposomale Glukokortikosteroide

Wie in vielen anderen medizinischen Bereichen limitieren auch in der Therapie der DMD die schwerwiegenden Nebenwirkungen der GS eine systemische Langzeitbehandlung. Dazu gehören die vermehrte Entwicklung von Osteoporose, Appetit- und Gewichtszunahme mit Stammfettsucht und cushingoidem Erscheinungsbild, Wesensveränderung, transiente Hyperglykämien und Blutdruckanstiege sowie Infektionsgefahr bis hin zu schweren Infektionen, Sepsis und Tod. Gerade für junge DMD-Patienten stellen diese unerwünschten Wirkungen oft auch eine subjektive Beeinträchtigung dar und tragen zu einem häufigen Therapieabbruch bei.

Um bei erhaltener Effektivität unerwünschte systemische Wirkungen zu reduzieren, wurde eine neue Verabreichungsform entwickelt, bei der GS liposomal „verpackt“ werden. Liposomen sind winzige, lipidummantelte Vesikel mit einem 100nm Durchmesser und einem hydrophilen Kern, der die phosphorylierten und damit wasserlöslichen GS enthält (Abb.1). Die Idee der liposomalen Verpackung von Medikamenten stammt aus den 70er Jahren.

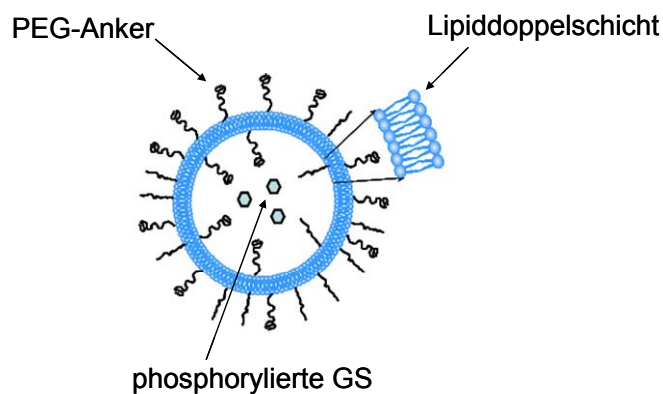


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Liposoms (modifiziert nach Metselaar et al. 2002)

Die ersten therapeutischen Erfolge wurden im Bereich der Hormonsubstitutionstherapie (Gregoriadis et al. 1974), der Chemotherapie (Gregoriadis et al. 1971) und der Behandlung von Schwermetallvergiftungen (Rahman et al. 1974) erzielt. Verschiedene Liposomenrezepturen wurden getestet und verglichen, wobei sich vor allem kleine Vesikelgrößen von 100nm und ein hoher Cholesterinanteil in der Lipiddoppelschicht bewährten (Love et al. 1990). Die erste Generation von Liposomen wurde größtenteils vom Retikuloendothelialen System (RES) in Leber und Milz aufgenommen. Um die RES-Aufnahme zu reduzieren und damit die Plasma-Halbwertszeit deutlich zu verlängern, wurden Liposomen an ihrer Oberfläche mit Polyethylenglykol (PEG)- Ankern versehen (Oku und Namba 1994; Woodle und Lasic 1992). Diese bewirken eine sterische Barriere, verhindern die Plasma-Protein-Bindung und Opsonisierung und können somit zu Plasma-Halbwertszeiten von bis zu 50 Stunden verhelfen (Gabizon et al. 1994; Woodle et al. 1994). Solche länger-zirkulierenden Liposomen sind seit einigen Jahren bereits in klinischer Anwendung, beispielsweise zur Applikation von Chemotherapeutika wie Daunorubicin, Doxorubicin oder Cisplatin (Cattel et al. 2004).

Die ersten GS-enthaltenden Liposomen wurden zur lokalen Behandlung der experimentellen Arthritis durch intraartikuläre Injektion entwickelt (Dingle et al. 1978) und später erfolgreich in klinischen Studien getestet (de Silva et al. 1979). Lang-zirkulierende Liposomen mit Prednisolon und Methylprednisolon als eingebundene GS wurden in verschiedenen Tiermodellen für Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis bereits erfolgreich eingesetzt und zeigten sich der herkömmlichen Therapie mit freien GS deutlich überlegen (Linker et al. 2008; Metselaar et al. 2003; Schmidt et al. 2003). Die Wirksamkeit der liposomalen Verpackung beruht auf verschiedenen Veränderungen in der Pharmakokinetik des verkapselten Medikaments. So kann einerseits die Plasma-Halbwertszeit deutlich verlängert werden (Schmidt et al. 2003), andererseits geht man davon aus, dass es durch Anreicherung der GS im entzündeten Zielgewebe mit gestörter vaskulär-endothelialer Schrankenfunktion zu einer Art „*drug-targeting*“ kommt.

1.5. Klinische und pathologische Verlaufsparemeter

Anhand eines neuartigen, voll computerisierten Laufradsystems kann der klinische Krankheitsverlauf von mdx-Mäusen präzise evaluiert werden. Die Laufräder in Einzelkäfigen sind permanent an einen Rechner angeschlossen, der sowohl die Laufristanz, Laufzeit und Geschwindigkeit über 24h als auch die Anzahl, Dauer und Strecke der einzelnen Läufe aufzeichnet (Liebetanz et al. 2004). Zur Untersuchung der spontanen Muskelkraft der Tiere dient die Messung der Greifkraft der Vorderläufe mittels *grip-strength-meter* als international etabliertes Verfahren. Wie bei der DMD ist auch bei der mdx-Maus das Muskelenzym CK im Serum stark erhöht und gilt als typischer serologischer Marker dystropher Erkrankungen. Zusätzlich kann der CK-Spiegel bei der DMD durch Prednisolon-Therapie vermindert werden (Drachman et al. 1974).

Wenn gesunde Muskelfasern, deren Kerne in der Peripherie der Faser lokalisiert sind, degenerieren, kommt es zur Proliferation von sogenannten *muscle precursor cells* oder Satellitenzellen, die zu Myotuben mit zentralisierten Kernen fusionieren und in unterschiedlichem Ausmaß hypertrophieren. Nach dem anschließenden Regenerationsprozess bleiben viele Kerne dauerhaft zentralisiert (Karpati et al. 1988). Damit wird verständlich, dass sowohl der Anteil von Fasern mit zentralisierten Kernen (engl.: *central nucleation index*, CNI) als auch die Variabilität der Muskelfasergrößen (Kaliberschwankungen) brauchbare Indikatoren für De- und Regenerationsprozesse im Muskel darstellen.

1.6. Expression von Entzündungsmediatoren

1.6.1. *Transforming growth factor β* (TGF β)

Der chronische Entzündungsprozess im dystrophen Skelettmuskel ist vermutlich ausschlaggebender Einflussfaktor der starken Fibrosierung. Im Rahmen dieses Prozesses werden Zytokine frei, die durch eingewanderte Immunzellen sezerniert werden und eine relative Entzündung im Muskel mit bedingen. So ist beispielsweise das inflammatorische Zytokin TGF β im DMD-Muskel entsprechend dem Fibrosierungsgrad erhöht (Bernasconi et al. 1995; Murakami et al. 1999). Auch im Zwerchfell der mdx-Maus ist TGF β sowohl auf Proteinebene (Hartel et al. 2001) als auch auf mRNA-Ebene (Gosselin et al. 2004) im Vergleich zum Wildtypmuskel überexprimiert. Entsprechend dem

bereits erläuterten Krankheitsverlauf ist die Hochregulation auf mRNA-Ebene bei 6 Wochen alten Mäusen mit Abstand am stärksten ausgeprägt. Durch kurzfristige Behandlung von mdx-Mäusen mit Prednisolon konnte die TGF β -Expression auf Proteinebene im Zwerchfellmuskel reduziert werden (Hartel et al. 2001).

1.6.2. Secreted phosphoprotein 1 (spp1)

Spp1 (auch Osteopontin) ist ein sezerniertes Multifunktionsprotein der extrazellulären Matrix. Es wurde zunächst aus Knochengewebe isoliert (Franzen und Heinegard 1985). Später konnte eine spp1 Sekretion in verschiedenen weiteren Geweben wie Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen beobachtet werden. Außerdem wurden dem Protein neben einer Regulatorfunktion in der Embryonalentwicklung und bei der Zellexpression und -differenzierung (Denhardt et al. 1995) unter anderem auch eine Zytokinfunktion bei Entzündungsprozessen zugeschrieben (Weber und Cantor 1996). Mit der Intention, eine Art dystrophiespezifischen molekularen Fingerabdruck zu erstellen, wurden DNA-Microarray-Analysen an verschiedenen mdx-Muskeln durchgeführt. Hier fand sich spp1 unter den am stärksten überexprimierten Genen im Bein- und Zwerchfellmuskel (Porter et al. 2003; Porter et al. 2004).

1.6.3. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1)

MCP1 (CCL2) ist ein C-C-Chemokin, dessen wesentliche Funktion in der Chemotaxis von Immunzellen zum Entzündungsort liegt (Gu et al. 1999). Im Beinmuskel der mdx-Maus ist die MCP1-Expression auf mRNA- und Proteinebene stark hochreguliert. Da das Protein außerdem im Serum von mdx-Mäusen erhöht ist, ist davon auszugehen, dass es auch in die Blutbahn sezerniert wird (Fang et al. 2000). Einflüsse einer GS-Therapie auf die Expression von spp1 oder MCP1 sind bisher nicht beschrieben.

1.7. Ziel dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Therapie von mdx-Mäusen mit liposomal verkapseltem Prednisolon (Prednisolon-Liposomen, PL) zu untersuchen und mit der Behandlung mit freien GS (Prednisolon) und

Kontrollmäusen im Hinblick auf klinische und pathologische Verlaufparameter sowie die Expressionsprofile von Entzündungsmediatoren zu vergleichen.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere

Alle Tierexperimente wurden an mdx- (C57BL/10ScSn mdx) oder Wildtyp-Mäusen (C57BL/10SnJ) durchgeführt. Die mdx-Mäuse stellen ein international anerkanntes Modell der DMD dar. Bei den verwendeten Tieren handelt es sich um eine hauseigene Zucht der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Georg-August Universität Göttingen. Die hierfür erworbenen Zuchttiere wurden freundlicherweise von Ralf Herrmann (Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden in Plastik Käfigen gehalten und erhielten handelsübliches Nagerfutter sowie Trinkwasser ad libitum. Die Versuche wurden gemäß den Bestimmungen der Bezirksregierung Braunschweig, Niedersachsen durchgeführt und von den zuständigen Veterinärbehörden genehmigt.

2.2. Therapieschema

Als Medikamente wurden Prednisolon (Prednisolut, Jenapharm, Jena, Deutschland) und PL (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J.M. Metselaar, Abteilung für Pharmazie, Utrecht Universität, Utrecht, Holland) eingesetzt. Als Kontrollsubstanzen dienten 0,9% NaCl und leere Liposomen. Die Tiere wurden im Alter von 3 Wochen anhand ihres Gewichtes und Alters stratifiziert und in Gruppen von ≥ 6 Tieren eingeteilt. Die Behandlung erfolgte durch intraperitoneale (i.p.) Injektion. Es wurde mit 1 mg/kg Körpergewicht (KG) Prednisolon vs. 10 mg/kg KG PL alle 3 Tage und mit 1 mg/kg KG Prednisolon täglich vs. 1 mg/kg KG PL jeden zweiten Tag behandelt. Die Kontrollgruppe wurde zur Hälfte mit 0,9% NaCl täglich und zur Hälfte mit 1mg/kg KG leeren Liposomen jeden zweiten Tag behandelt. Das Applikationsvolumen betrug stets 200 μ l.

2.3. Laufrad

Zur Messung und Aufzeichnung des Laufverhaltens als klinische Parameter für die Krankheitsaktivität wurden die Tiere in Einzelkäfigen mit Laufrädern gehalten. Die Laufräder hatten einen Durchmesser von 38 cm und waren an einen Computer angeschlossen, der mittels MatLab Software (The MathWorks, Natick, USA) Laufgeschwindigkeit, Laufradius und Laufzeit jeder

einzelnen Maus aufzeichnete. Die Lichtsteuerung des Raumes war mit Hilfe einer Zeitschaltuhr auf einen zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus mit einer Lichtphase von 7:00 bis 19:00 eingestellt. Um den Schlaf-Wach-Rhythmus der Mäuse nicht zu stören, waren die Besuchszeiten des Raumes auf je 1,5 h an Anfang und Ende der Lichtphase beschränkt. Die Temperatur des Raumes lag konstant bei ca. 24 °C, die relative Luftfeuchtigkeit bei ca. 45%.

2.4. Kraftmessung

Die Griffkraft der vorderen Extremität wurde mittels eines *grip-strength-meter* (TSE Systems, Bad Homburg) gemessen. Hierbei greift die Maus beim Zurückziehen reflexartig nach einem Metallbügel; übersteigt die nach hinten ziehende Kraft des Untersuchers diejenige der Maus, so lässt diese los. Auf einer Digitalanzeige wird die erreichte Griffstärke kontinuierlich angezeigt und kann dokumentiert werden. Griffkraftmessungen erfolgten einmal pro Woche während der Behandlungszeit. Jede Maus wurde aufeinanderfolgend 3 Messungen unterzogen, deren Ergebnisse gemittelt wurden.

2.5. Gewebeaufbereitung

Am Ende eines Experiments wurden die Tiere mittels einer letalen CO₂-Narkose getötet und Gastrocnemius und Zwerchfell wurden entnommen. Der Gastrocnemius einer Extremität und die Hälfte des Zwerchfells wurden auf geeigneten Korkplatten (Slee Mainz, Mainz) aufrecht stehend mit Tissue-Tek (Sakura, Zweterwoude, Holland) überschichtet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Der Gastrocnemius der anderen Extremität und die zweite Zwerchfellhälfte wurden in RNase-freien 1,5-ml-Eppendorfgefäßen für eine spätere RNA-Extraktion bei -80°C eingefroren. Unmittelbar nach der letalen Narkose, wurde transthorakal kardiales Blut entnommen und für 10 Minuten bei 13 000 Umdrehungen zentrifugiert. Aus dem gewonnenen Serum wurde vom Zentrallabor der Abteilung Klinische Chemie der Universität Göttingen nach deren Protokollen im Rahmen der Routinediagnostik die Serum-CK jeder Maus in Units/Liter bestimmt.

2.6. Histologie und Immunhistochemie

10µm dicke Querschnitte von Gastrocnemius und Zwerchfell wurden an einem Cryo-Mikrotom (Leica CM 3050 S, Leica Mikrosysteme, Wetzlar) angefertigt und auf Adhäsions-Objektträger (Menzel, Braunschweig) aufgezogen. Nach 5-stündigem Trocknen wurde mit Hämatoxilin/Eosin (H&E; Mayers Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt/Eosin G, Merck, Darmstadt) nach standardisierten histologischen Methoden gefärbt oder bis zur immunhistochemischen Färbung bei -80°C gelagert.

Für immunhistochemische Färbungen wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation mit bovinem Serumalbumin (BSA; Merck, Darmstadt) 10% in PBS für 30 Minuten blockiert. Als Primäantikörper diente ein monoklonaler Makrophagenmarker (Ratte-anti-Maus F4-80, FITC, MCA 497FB, Serotec, Düsseldorf), der 1:500 verdünnt in 1% BSA in PBS, über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen und für 1 Stunde bei RT mit einem Ziege-anti-Ratte-IgG (DAKO, Hamburg; 1:200 verdünnt in 1% BSA in PBS) als Sekundäantikörper inkubiert. Der Sekundäantikörper wurde mit dem ABC-System (DAKO, Hamburg) detektiert. Die endogene Peroxidase wurde mit 3% H₂O₂ (Roth, Karlsruhe) und 0,2 M Na-Azid in Methanol (Roth, Karlsruhe) geblockt. Als Färbesubstrat diente 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB; Merck, Darmstadt). Alle Schnitte wurden mit Hämalaun für 30 Sekunden gegengefärbt, über die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 99%) dehydriert und nach Xylol mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

2.7. Auswertung der Gewebeschnitte

Alle Auswertungen wurden verblindet durchgeführt. Histologische Färbungen wurden durch ein aufrechtes Mikroskop (BX51, Olympus, Hamburg) betrachtet und mittels digitaler Mikroskopkamera (Color View, Soft Imaging Systems, Olympus, Hamburg) fotografiert. Zur Bestimmung des CN1 wurden je Muskel ca. 1000 Fasern mit Hilfe der *analySIS^B_1045* Software (Olympus, Hamburg) manuell ausgezählt und der Anteil der Fasern mit zentralisierten Kernen in Prozent bestimmt. Zur Determination der mittleren Fasergröße wurde der jeweils größte Durchmesser von ca. 300 Fasern pro untersuchtem Querschnitt mittels *analySIS^B_1045* Software gemessen. Die

Standardabweichung vom Mittelwert dieser Faserdurchmesser diente zur Bestimmung der Kaliberschwankungen. Zur Quantifizierung der Makrophageninfiltrationen wurde je ein Gesamtquerschnitt von Gastrocnemius und Diaphragma ausgezählt.

2.8. RNA-Aufreinigung und cDNA-Synthese

Gefrorenes Muskelgewebe wurde in 300 µl TRIZOL[®] (Invitrogen, Karlsruhe) im elektrischen Homogenisator (precellys 24, peqlab, Erlangen) zerkleinert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform (Roth, Karlsruhe) und Zentrifugation für 15 min bei 13 000 rpm wurde der Überstand abgenommen und mit 200 µl 70% Ethanol versetzt. Anschließend wurde die RNA mittels RNA Isolationskit (*RNA easy kit*, QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers extrahiert und bei -80 °C gelagert. Um zur RNA komplementäre cDNA zu gewinnen, wurde nach Konzentrationsbestimmung mittels „nanodrop“ (ND-1000 *Spectrophotometer*, peqlab, Erlangen) 200 ng RNA zur reversen Transkription eingesetzt. Nach Zugabe von 1 µl Oligo (dT), 1 µl dNTP Mix (10mM) und der entsprechenden Menge Wasser wurde das Reaktionsgemisch von 10 µl für 5 Minuten auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurden 4 µl 5x *first strand buffer*, 2 µl 0,1 M DTT und kurz vor Reaktionsbeginn 1 µl *Super script* zugegeben (alle Reagenzien von Invitrogen, Karlsruhe). Die cDNA Synthese erfolgte unter folgenden Bedingungen: 42 °C für 50 min, 70 °C für 15 min, 4 °C unendlich in einem programmierbaren Heizblock.

2.9. Quantitative PCR

Bei der *real-time* PCR wird die Vermehrung des PCR-Produktes durch Fluoreszenzmessung direkt während der Amplifikation analysiert. Oligonucleotid-Primer und FAM-Sonden wurden von Applied Biosystems (Taq Man Expression Assays, Applied Biosystems, Darmstadt) bezogen. Zur Amplifikation wurde ein Universal qPCR Master Mix (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend den Anleitungen des Herstellers verwendet. Jeder Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 20 µl die forward- und reverse-Primer von TGFβ1 (assay ID: Mm00441724_m1), spp1 (assay ID: Mm00436767_m1) bzw. MCP1 (assay ID: Mm00441242_m1) sowie die entsprechende Sonde, 0,5 µl cDNA und 0,05 µl Rhodamine (Rox, Invitrogen, Karlsruhe). Die Amplifikation wurde im real-time-PCR-System-ABI 7900 (Applied Biosystems, Darmstadt) unter

Verwendung des folgenden Zeit-Temperatur-Programms durchgeführt: Nach einem 2-minütigen Dekontaminierungsschritt bei 50 °C und einem ersten Denaturierungsschritt (10 min 95 °C) wurde in 40 Zyklen mit jeweils 15 sec bei 95 °C und anschließend 60 sec bei 60 °C amplifiziert. Um Ergebnisverfälschungen durch Menge und Qualität der eingesetzten cDNA auszugleichen, wurde von jeder cDNA die Expression von *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH; assay ID: Mm99999915_g1) ebenfalls quantifiziert und als Referenz oder „Housekeeping“-Gen verwendet. Die jeweilige relative mRNA-Expression wurde mittels der $2^{-\text{avg } dCt}$ Methode errechnet.

2.10. Statistik

Die statistischen Analysen erfolgten unter Verwendung des t-Tests (Microsoft Excel).

3. Ergebnisse

3.1. mdx-krankte Mäuse zeigen herabgesetzte Laufleistung

Zur Etablierung der Laufradmessung als Methode der klinischen Verlaufsbeobachtung von mdx-Mäusen wurde zunächst das Laufverhalten von unbehandelten mdx Mäusen untersucht und mit dem von gleichaltrigen Mäusen des entsprechenden Wildtypstammes verglichen. Bei einer Gruppengröße von 12 (mdx) bzw. 14 (Wildtyp) wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen die Laufdistanz und Geschwindigkeit der einzelnen Tiere elektronisch aufgezeichnet. Es zeigte sich eine deutlich herabgesetzte Laufleistung ($p < 0,001$) und eine wesentlich geringere interindividuelle Streuung in der mdx-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 2)

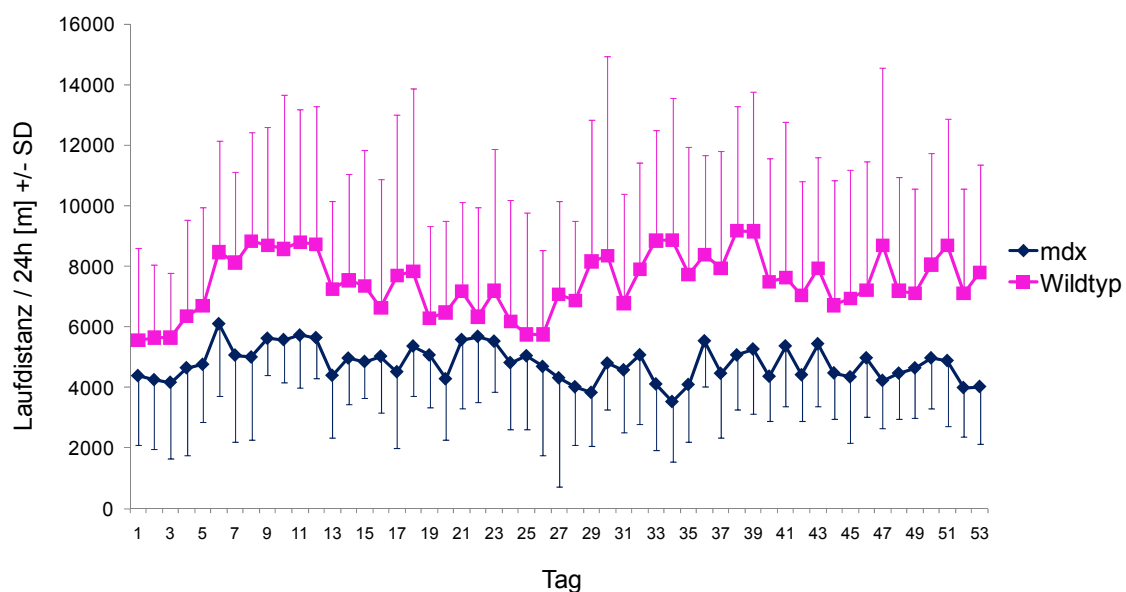


Abbildung 2: Laufdistanz pro 24h von mdx-Mäusen (blau; Rauten) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (rot; Quadrate).

3.2. Laufradtraining zeigt keine Auswirkungen auf den dystrophischen Umbau

Zur Testung eines Einflusses des Laufradlaufs auf das Ausmaß der Dystrophie wurden 3 Wochen alte mdx-Mäuse über einen Zeitraum von 3 weiteren Wochen im Laufrad laufen gelassen und post mortem mit gleichaltrigen Mäusen, die nicht gelaufen waren, verglichen. Zu diesem Zweck wurden Gewebeproben aus Bein- und Zwerchfellmuskel entnommen und histologisch aufgearbeitet. H&E-gefärbte Schnitte wurden im Hinblick auf die

Dystrophie-typischen pathomorphologischen Veränderungen untersucht. So wurden die durchschnittliche Fasergröße, die Kaliberschwankungen und der CNI an Querschnitten von Gastrocnemius und Diaphragma ermittelt. Kaliberschwankungen und CNI, die typischen myogenen Schädigungsmuster, waren in Bein- und Zwerchfellmuskel der mdx-Maus signifikant erhöht im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3a-f; 4b-c). Anhand von immunhistochemischer Färbung wurden Makrophagen quantifiziert. Im Beinmuskel der mdx-Maus fanden sich signifikant mehr infiltrierte Zellen / mm² als beim Wildtyp, während das Zwerchfell kaum Infiltrate aufwies (Abb. 4d). Wider Erwarten fanden sich keine Unterschiede in Fasergrößen, Kaliberschwankungen, CNI oder Makrophageninfiltraten zwischen „Läufern“ und „nicht-Läufern“ (Abb. 3,4), sodass die 3-wöchige Phase im Laufrad keine messbaren Auswirkungen auf den dystrophischen Umbau der beiden Muskeln hatte.

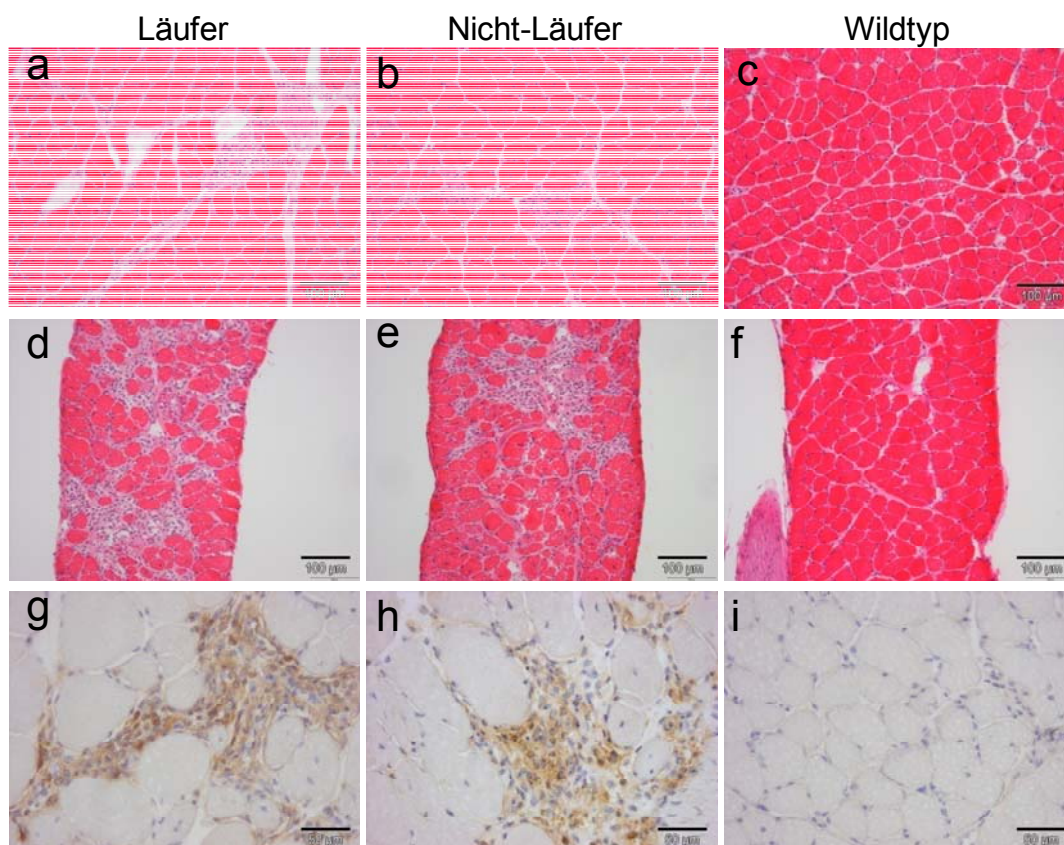


Abbildung 3 a-f: H&E Färbungen von Gastrocnemius (a-c) und Diaphragma (d-f) von mdx-Mäusen mit (a,d) bzw. ohne (b,e) 3-wöchige Laufperiode im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (c,f) Balken: 100µm. **g-i:** Immunhistochemische Makrophagendetektion mit F 4/80 Antikörper und DAB-Substrat in Gastrocnemius-Querschnitten von mdx-Mäusen mit (g) bzw. ohne (h) 3-wöchige Laufperiode im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (i) Balken: 50µm.

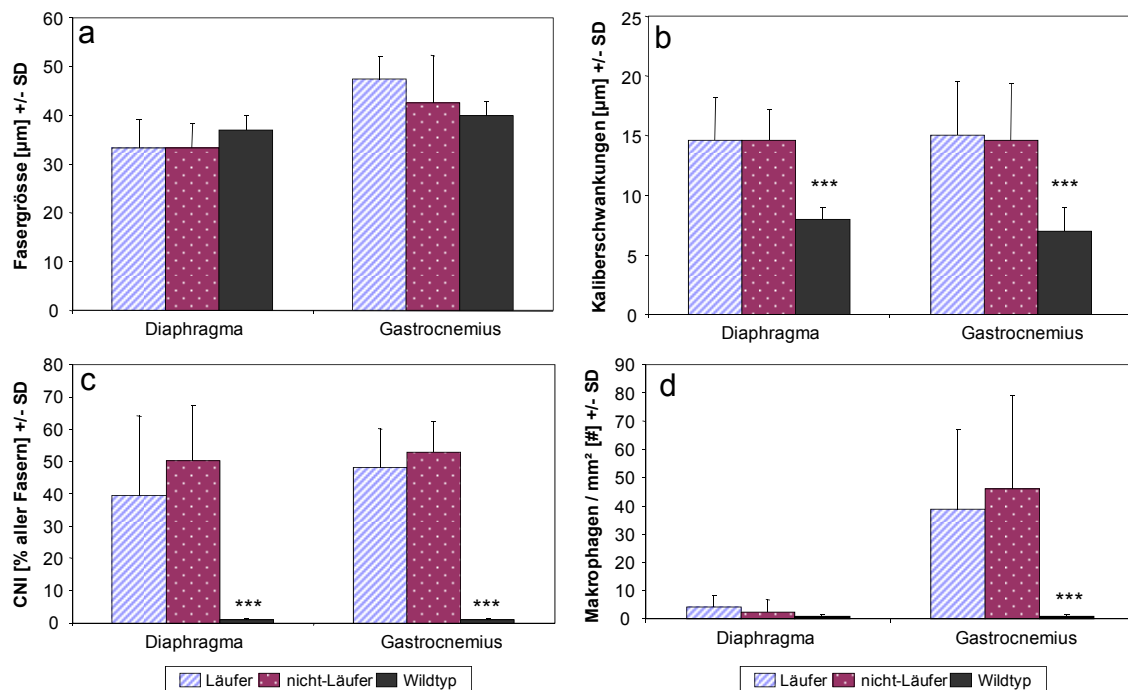


Abbildung 4: Durchschnittlicher Muskelfaserdurchmesser (a), Kaliberschwankungen (b), CNI (c) und Makrophageninfiltrationen (d) von mdx-Mäusen mit (Läufer, blau, gestreift) oder ohne (nicht-Läufer, rot, gepunktet) 3-wöchige Laufperiode im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (schwarz, ohne Muster). ***p < 0,001.

Nach Isolation von mRNA aus Bein- und Zwerchfellmuskel und anschließender Umschreibung in cDNA wurde die mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmediatoren untersucht. Im Gastrocnemius waren MCP1 (p=0,005), spp1 (p=0,002) sowie auch TGFβ (p=0,0008) bei der mdx-Maus überexprimiert im Vergleich zum Wildtyp. Auch im Diaphragma fand sich jeweils eine signifikante Hochregulation (MCP1: p=0,0007; spp1 p=0,049; TGFβ: p=0,007), die allerdings starken interindividuellen Schwankungen unterworfen war. Es fiel auf, dass die Überexpression im Zwerchfell signifikant stärker zur Ausprägung kam als im Gastrocnemius (TGFβ: p=0,01; MCP1: p=0,004). Sowohl die interindividuellen Schwankungen als auch die Unterschiede zwischen Bein- und Zwerchfellmuskel bestanden unabhängig vom Laufradtraining. Insgesamt waren die Auswirkungen des Laufens hier zwar messbar, wiesen aber keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu nichtlaufenden Kontrollmäusen auf.

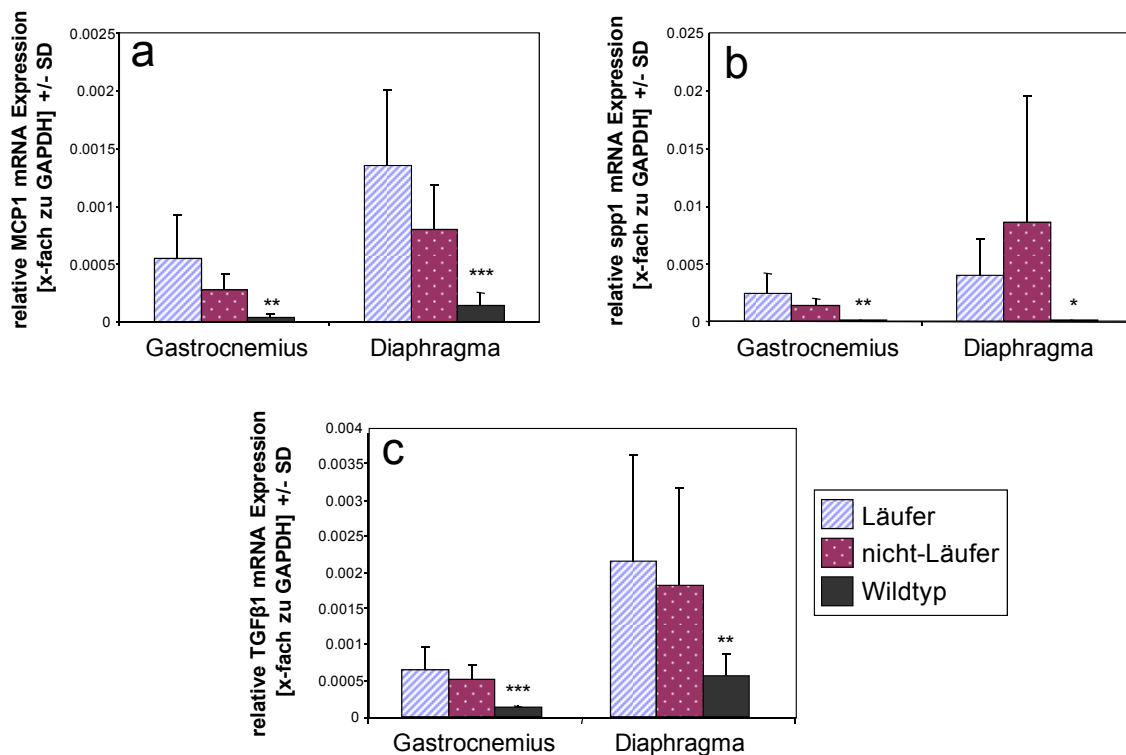


Abbildung 5: Relative mRNA-Expression mittels qPCR von MCP1 (a), TGFβ1 (b) und spp1 (c) im Gastrocnemius- und Diaphragma-Muskel von mdx-Mäusen mit (Läufer, blau, gestreift) oder ohne (nicht-Läufer, rot, gepunktet) 3-wöchige Laufperiode im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (schwarz, ohne Muster). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3. Behandlung mit 1mg/kg PL vs. 10mg/kg Prednisolon alle 3 Tage vs. Kontrolle

In der Behandlung von Tiermodellen chronisch entzündlicher Erkrankung mit GS enthaltenden Liposomen im Vergleich zu freien GS hatten sich GS-Liposomen nach 10-facher Dosisreduktion in der Vergangenheit stets deutlich überlegen gezeigt (Linker et al. 2008; Metselaar et al. 2003; Schmidt et al. 2003). Um den möglichen Stressfaktor, der für die Tiere durch die i.p. Injektion entsteht, zu vereinheitlichen, wählten wir verschiedene Dosierungen bei gleichen Injektionshäufigkeiten. So wurden in einem Experiment mit 5 Tieren pro Gruppe 3 Wochen alte mdx-Mäuse jeden dritten Tag mit PL in einer Dosierung von 1mg/kg KG beziehungsweise freiem Prednisolon in einer Dosierung von 10mg/kg KG beziehungsweise NaCl als Kontrolle über einen Zeitraum von 3 Wochen behandelt. Laufdistanz und Maximalgeschwindigkeit pro 24h wurden über den gesamten Behandlungszeitraum für jede einzelne Maus aufgezeichnet und ergaben keine Verbesserung der Laufleistung durch die Behandlung mit PL oder Prednisolon (Abb. 6).

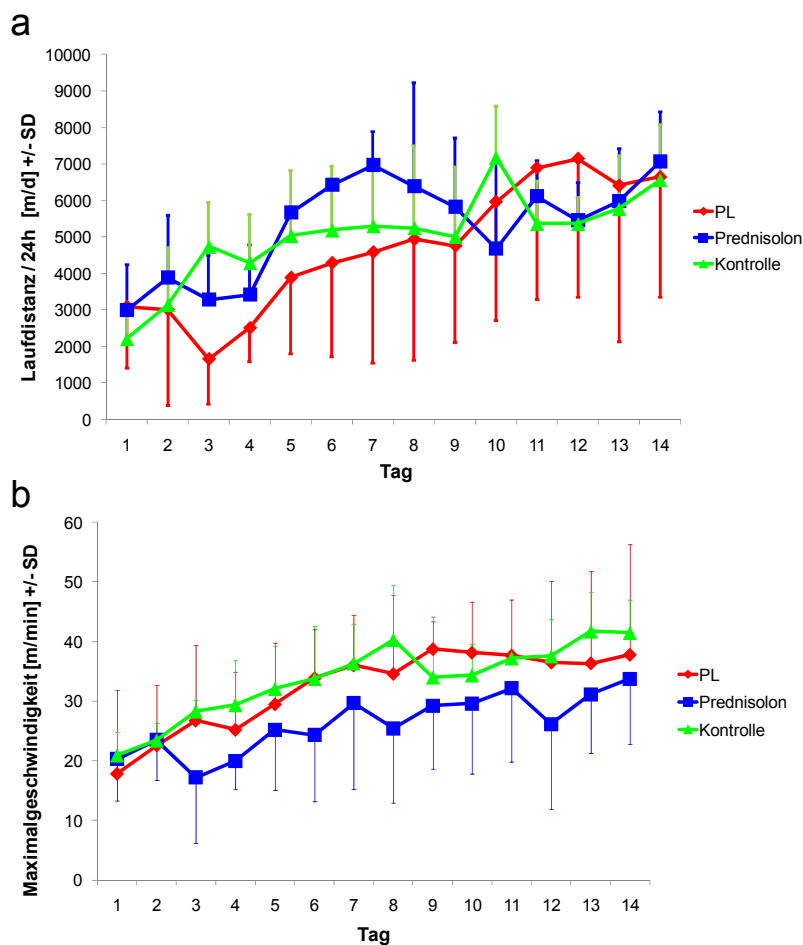


Abbildung 6: Laufstrecke pro 24h (a) und Maximalgeschwindigkeit je 24h (b) von Mäusen die mit PL (rot, Rauten), Prednisolon (blau, Quadrate) oder NaCl (grün, Dreiecke) behandelt wurden.

Um die Steigerung der Laufleistung der einzelnen Gruppen näher zu untersuchen, wurde die Zunahme der durchschnittlichen Laufdistanz über die Behandlungsperiode ermittelt. Die Verbesserung der Laufleistung war in den PL- und Prednisolon-behandelten Gruppen ähnlich wie in der Kontrollgruppe und spiegelt vermutlich einen allgemeinen Trainingseffekt wider (Abb. 7a). Die Kraftmessung der Vorderläufe blieb unbeeinflusst durch die Therapie mit PL oder Prednisolon. Am Ende der Behandlungszeit hatten mdx-Mäuse aller Gruppen eine gegenüber den Wildtyp-Mäusen uneingeschränkte Greifkraft, was den milden Phänotyp der mdx-Maus widerspiegelt. Die Creatin-Kinase im Serum der mdx-Mäuse war signifikant erhöht im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ($p= 0,001$) und blieb unverändert durch die Behandlung mit PL oder Prednisolon (Abb. 7b,c).

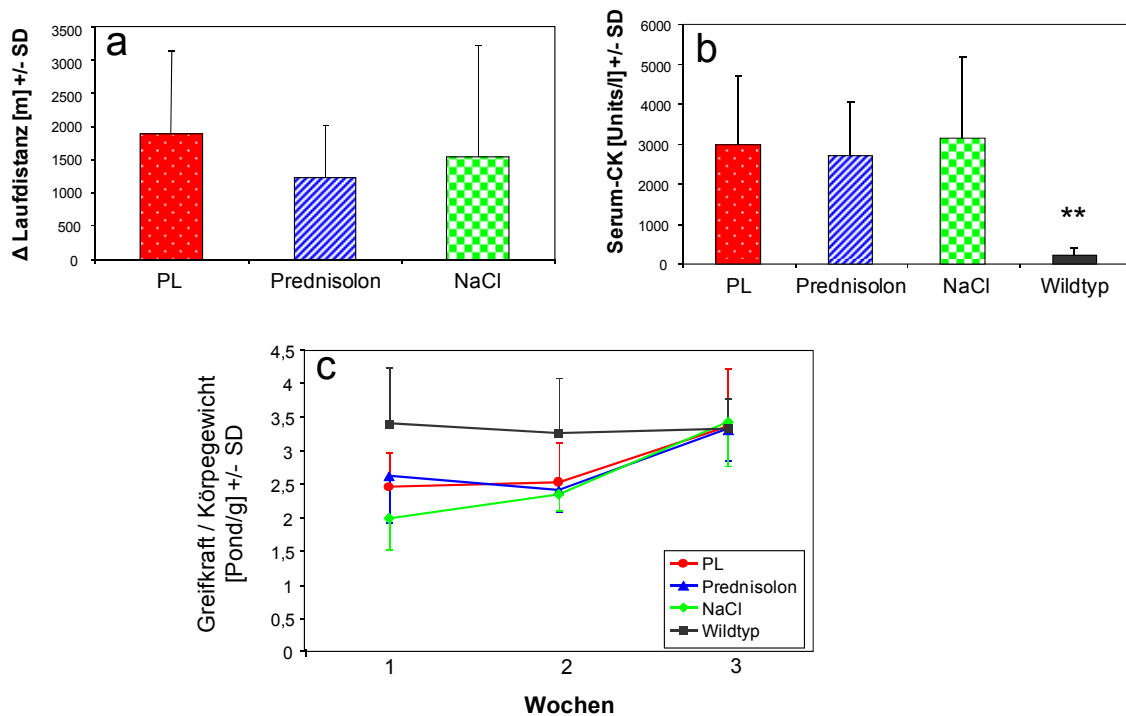


Abbildung 7 a,b: Differenz der Laufdistanz zwischen Beginn und Ende der Behandlungsperiode (a) sowie Serumkreatinkinase nach Behandlungsende (b) von Mäusen, die mit PL (rot, gepunktet), Prednisolon (blau, gestreift) oder NaCl (grün, kariert) behandelt wurden. ****p**< 0,01. **c:** Vorderpfotengreifkraft in Relation zum Körpergewicht von Mäusen, die mit PL (rot, Kreise), Prednisolon (blau, Dreiecke) oder NaCl (grün, Rauten) behandelt wurden im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (schwarz, Quadrate). Die Messung wurde zu Beginn jeder Behandlungswoche mittels ‚grip-strength-meter‘ durchgeführt.

Die Entzündungsmediatoren TGF β 1, MCP1 und spp1 waren bei der mdx-Maus signifikant überexprimiert im Vergleich zum Wildtyp. Im Zwerchfell war die Hochregulierung deutlicher als im Beinmuskel. Auch nach Ausschluss von statistischen Ausreißern war die interindividuelle Variation besonders im Zwerchfell hoch, vor allem die der spp1-Expression. Die Behandlung der Mäuse mit PL oder Prednisolon hatte im Vergleich zu Kontrollmäusen keinen Einfluss auf die Expression von TGF β 1, MCP1 oder spp1 (Abb. 8).

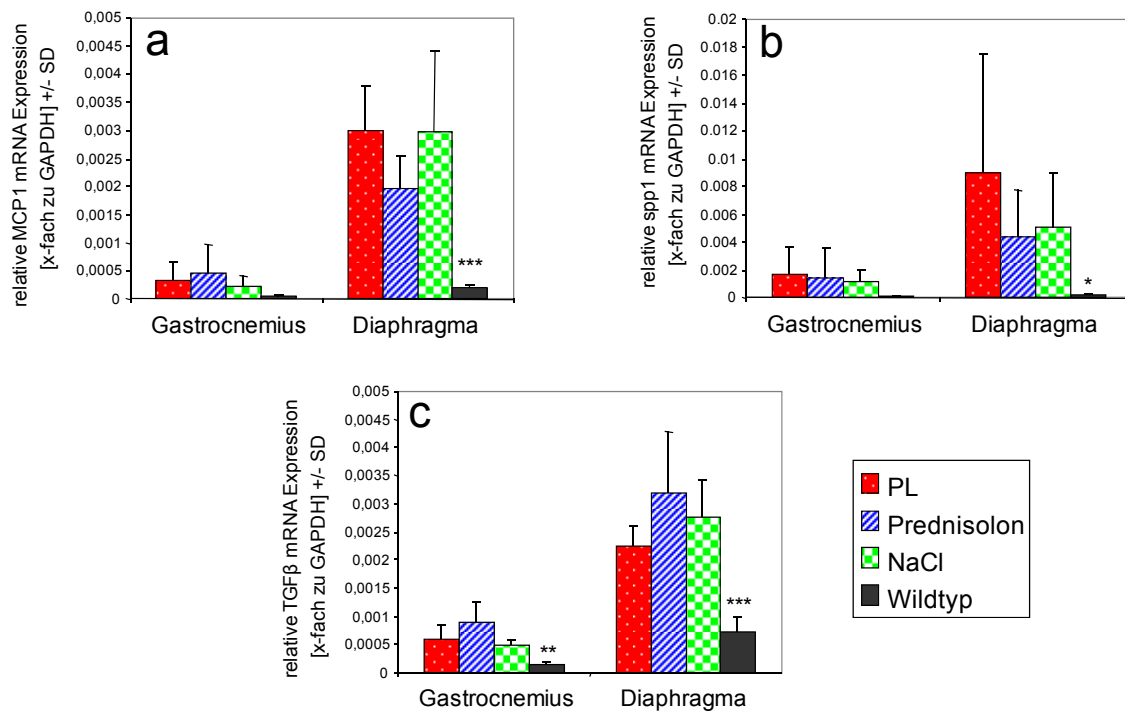


Abbildung 8: Relative mRNA Expression mittels qPCR von MCP1 (a), spp1 (b) und TGFβ1 (c) im Gastrocnemius und Diaphragma von Mäusen, die mit PL (rot, gepunktet), Prednisolon (blau, gestreift) oder NaCl (grün, kariert) behandelt wurden im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (schwarz, ohne Muster). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.4. Behandlung mit 1mg/kg PL jeden 2. Tag vs. 1mg/kg Prednisolon täglich vs. Kontrolle

Nachdem das zuvor beschriebene Behandlungsregime keine messbaren Therapieeffekte gezeigt hatte, erhöhten wir in weiteren Experimenten mit zunächst 12 Tieren pro Gruppe die Injektionshäufigkeit der PL auf jeden 2. Tag. Verglichen wurde mit einem in der GS-Behandlung der mdx-Maus etablierten Regime von 1 mg/kg KG Prednisolon täglich. Um eventuelle unspezifische Effekte der liposomalen Formulierung zu detektieren, wurden in der Kontrollgruppe 6 Tiere mit NaCl und weitere 6 Tiere mit leeren Liposomen behandelt. Da sich zwischen diesen beiden Gruppen keine Unterschiede zeigten, wurden alle 12 Tiere zu einer Kontrollgruppe zusammengefasst. Auch durch dieses Therapieregime blieb die Laufleistung der Tiere weitestgehend unbeeinflusst. Wie Abb. 9 zeigt, erbrachte die PL-behandelte Gruppe im Hinblick auf Gesamtlafstrecke und Gesamtlafzeit tendenziell die beste Leistung, wobei die Unterschiede zu den beiden anderen Gruppen jedoch nicht signifikant waren.

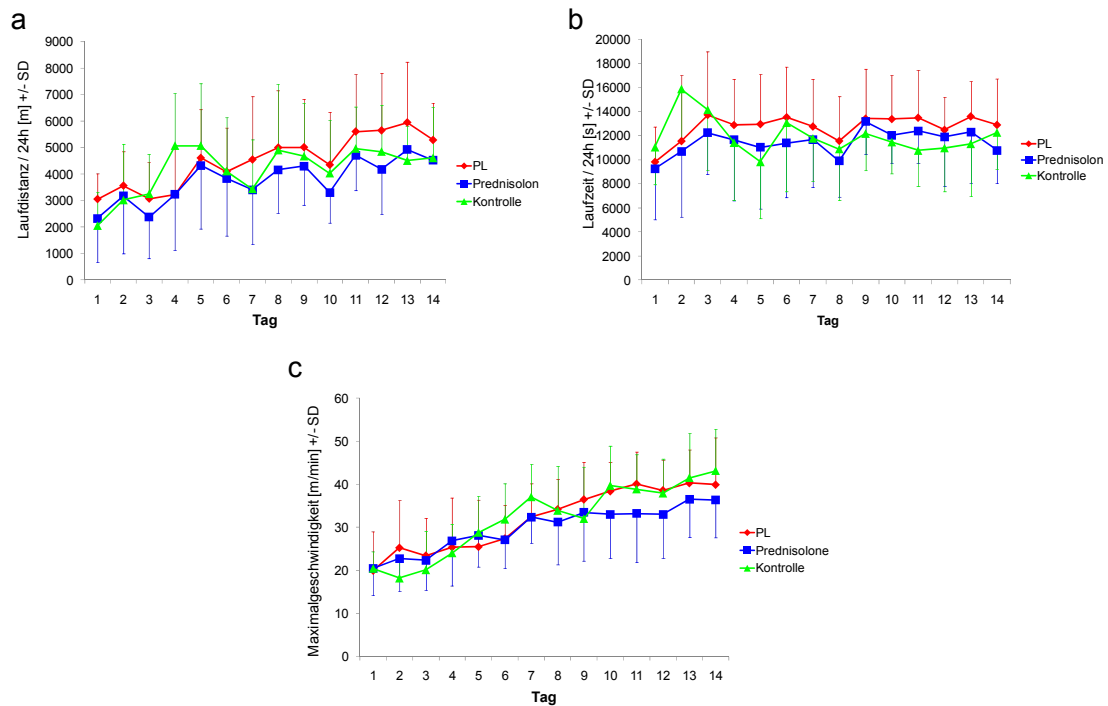


Abbildung 9: Absolute Laufstrecke (a) und Laufzeit (b) pro 24h und Maximalgeschwindigkeit je 24h (c) von Mäusen, die mit PL (rot, Rauten), Prednisolon (blau, Quadrate) oder NaCl/leere Liposomen (grün, Dreiecke) behandelt wurden.

Auch andere Parameter, wie die Strecke des längsten Laufes pro 24h, waren länger bei den liposomenbehandelten Tieren, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Interessanterweise war die Zeitdauer dieses längsten Laufes wiederum bei allen Gruppen weitestgehend gleich sowie auch die Anzahl und die mittlere Dauer der einzelnen Läufe (Abb.10).

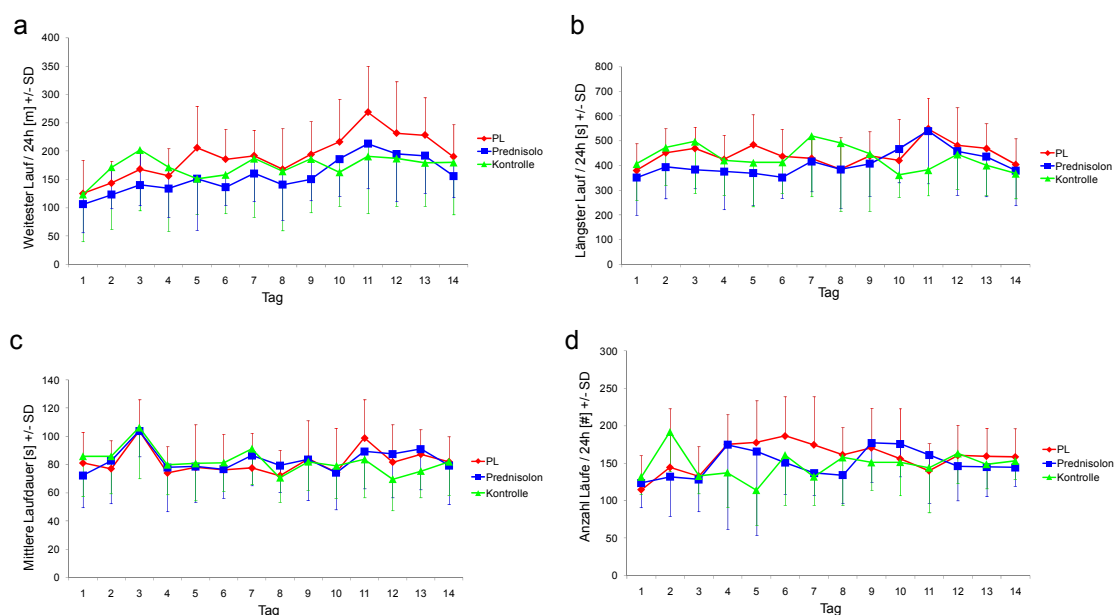


Abbildung 10: Strecke (a) und Dauer (b) des weitesten Laufes pro 24h, mittlere Dauer der einzelnen Läufe (c) und Anzahl der Läufe pro 24h (d) von Mäusen, die mit PL (rot, Rauten), Prednisolon (blau, Quadrate) oder NaCl/leere Liposomen (grün, Dreiecke) behandelt wurden.

Der CNI, die Kaliberschwankungen und die Menge infiltrierter Makrophagen war im Gastrocnemius und Diaphragma der mdx-Maus signifikant erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Interessanterweise fanden sich unabhängig von der Behandlung deutliche Unterschiede zwischen Zwerchfell- und Beinmuskel der mdx-Mäuse. Der durchschnittliche Faserdurchmesser im Beinmuskel der mdx Maus war größer als beim Wildtyp, so dass hier die Muskelhypertrophie gegenüber der Atrophie zu überwiegen scheint. Andersherum verhielt es sich im Zwerchfell, wo die Fasern im Durchschnitt kleiner waren als im Wildtypmuskel. Die Kaliberschwankungen wiederum waren in beiden Muskeln gegenüber dem Wildtyp ähnlich stark erhöht.

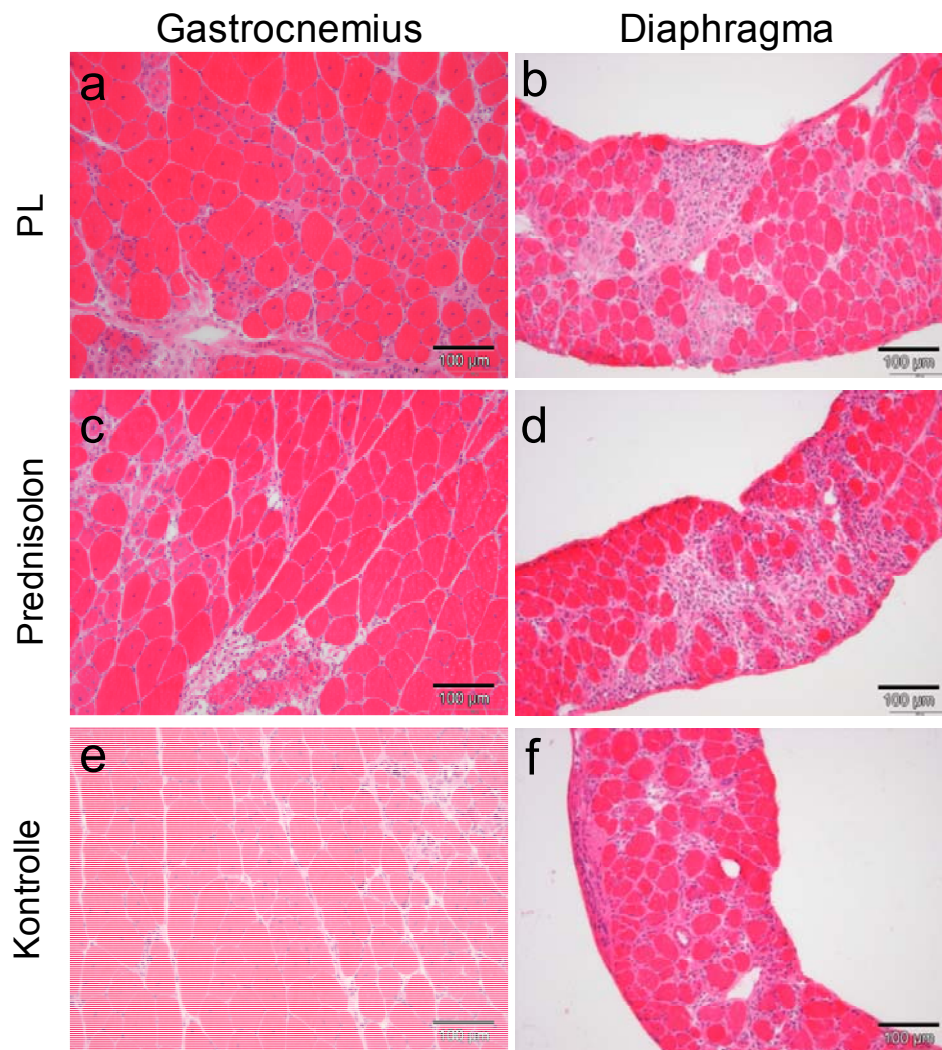


Abbildung 11: H&E-gefärbte Querschnitte von Gastrocnemius (a-e) und Diaphragma (b-f) von Mäusen, die mit PL (a,b), Prednisolon (c,d) oder NaCl/leere Liposomen (e,f) behandelt wurden. Balken: 100µm.

Der fibrotische Umbau als deutlicher Degenerationsparameter war im Zwerchfell ausgeprägter als im Beinmuskel. Der CNI, der als Indikator für regenerative Prozesse betrachtet werden kann, war wiederum im Bein höher als im Zwerchfell. Makrophageninfiltrate fanden sich vorwiegend im Beinmuskel. Die Behandlung mit PL oder Prednisolon hatte keinen Einfluss auf den dystrophischen Umbau der beiden Muskeln (Abb. 11; 12a-c) oder die Makrophageninfiltration (Abb.12d).

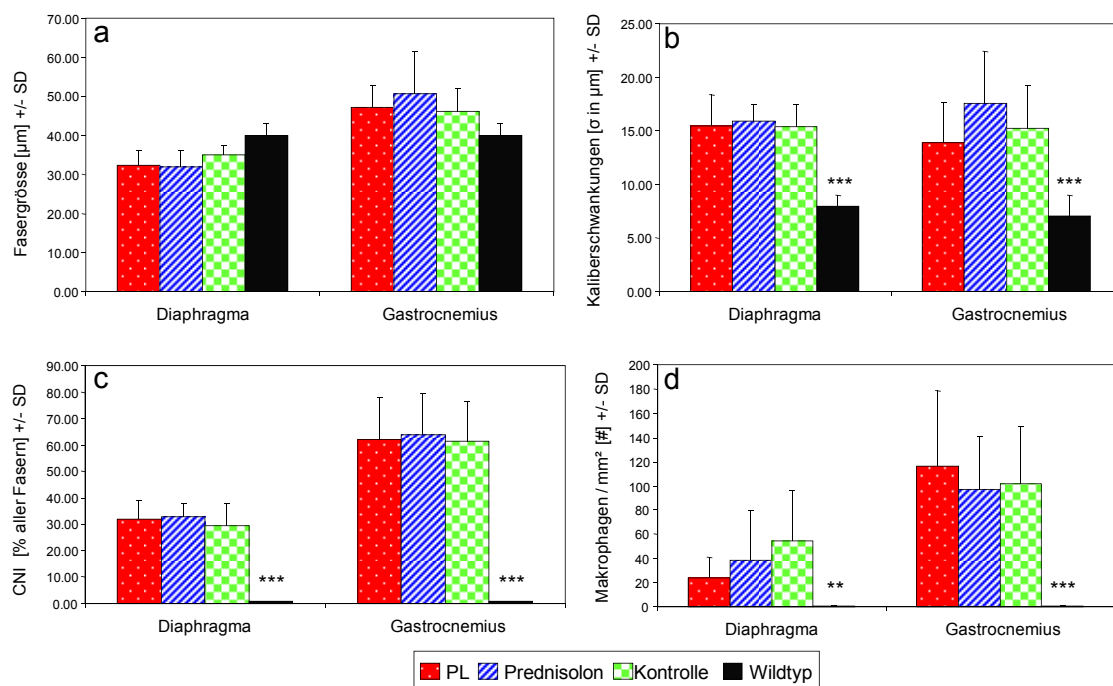


Abbildung 12: Durchschnittlicher Muskelfaserdurchmesser (a), Kaliberschwankungen (b), CNI (c) und infiltrierte Makrophagen (d) von Mäusen, die mit PL (rot, gepunktet), Prednisolon (blau, gestreift) oder NaCl/leere Liposomen (grün, kariert) behandelt wurden im Vergleich zu Wildtypmäusen (schwarz, ohne Muster). ** $p < 0,01$; *** $p = 0,001$

Das beschriebene Behandlungsschema wurde in kleineren Gruppengrößen mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert. In keinem der Experimente fanden sich messbare Auswirkungen einer Behandlung mit PL oder Prednisolon auf den klinischen Krankheitsverlauf, pathomorphologische Dystrophiekriterien oder die mRNA Expression von entzündlichen Mediatoren.

4. Diskussion

Die einzige derzeit etablierte medikamentöse Langzeittherapie der DMD ist eine Behandlung mit oralen GS. Insgesamt ist diese aufgrund des ungünstigen Verhältnisses von Wirkung und Nebenwirkung nicht unumstritten. Vor diesem Hintergrund war Zweck der vorliegenden Arbeit, „liposomal verpackte“ GS als Therapiealternative der DMD zu testen und durch hohe lokale Wirkspiegel bei geringer systemischer Konzentration dem Missverhältnis von Wirkung und Nebenwirkung entgegenzutreten. Bei mehrfach reproduzierten Experimenten mit konsistenten Ergebnissen blieben sowohl der klinische Krankheitsverlauf als auch das Ausmaß dystrophischen Umbaus von Gastrocnemius und Diaphragma und die mRNA Expressionsraten von TGF β , MCP1 und spp1 durch die Behandlung von mdx-Mäusen mit sowohl liposomalem als auch mit freiem Prednisolon unverändert.

Die Studienlage zur Wirksamkeit freier GS in der Behandlung der mdx-Maus ist sehr heterogen. Hierbei ist zu beachten, dass in den verschiedenen Untersuchungen Rahmenbedingungen wie Dosierung, Verabreichungsform, Alter der Mäuse bei Behandlungsbeginn und Behandlungsdauer unterschiedlich gehandhabt wurden. Die meisten Autoren, die therapeutische Effekte beobachteten, behandelten mit Prednisolon in einer Dosierung von 0,75-1 mg/kg/Tag (Hartel et al. 2001; Lim et al. 2004; Wehling-Henricks et al. 2004) beziehungsweise 5 mg/kg 2 mal pro Woche (Golumbek et al. 2007; Keeling et al. 2007) oder mit Deflazakort in Dosierungen von 1,2 mg/kg/Tag (Archer et al. 2006) oder 1 mg/kg alle 2 Tage (St Pierre et al. 2004). Insgesamt haben sich solche niedrigen Dosierungen bewährt, während GS in höherer Dosis ihre Wirksamkeit teilweise einzubüßen scheinen. So wurde über einen Kraftzuwachs nach Behandlung mit 1mg/kg Prednisolon pro Tag und kraftmindernde Effekte durch Dosierungen von 5, 10 und 20 mg/kg/Tag berichtet (Granchelli et al. 2000). Diese Beobachtung könnte auf katabolische Effekte von GS in hoher Dosierung zurückzuführen sein. Es ist möglich, dass auch die in der vorliegenden Arbeit gewählten Dosierungen katabolische Effekte hervorriefen und dadurch die unzureichende Wirksamkeit der GS-Therapie mit bedingten.

Da mdx-Mäuse im Alter von 6-8 Wochen das Maximum der fassbaren Pathologie bieten, wird dieser Zeitpunkt in den meisten tierexperimentellen Studien als Endpunkt gewählt. Passend dazu zeigten sich nach 2-wöchiger Prednisolon-Behandlung von 2 Wochen alten Mäusen deutliche therapeutische Effekte (Wehling-Henricks et al. 2004), während eine ein- beziehungsweise 6-wöchige Therapie von 6 Wochen alten Mäusen kaum eine Wirkung zeigte (Fisher et al. 2005). Vor diesem Hintergrund begannen wir die Behandlung der Mäuse im Alter von 3 Wochen und beendeten jedes Experiment im Alter von 6 Wochen. Damit wählten wir eine vergleichsweise kurze Behandlungs- und Beobachtungszeit von 3 Wochen. Letztendlich hätten sich Therapieeffekte gegebenenfalls erst nach längerer Therapie beziehungsweise zu späterem Beobachtungszeitpunkt eingestellt. Ein solcher Zeitfaktor könnte auch die unzureichenden Effekte des Laufradlaufs auf histopathologische Muskelschädigungsparameter erklären, die mit ähnlichen Experimenten im Widerspruch stehen (Bizario et al. 2009; Brussee et al. 1997; De Luca et al. 2003; Okano et al. 2005; Sandri et al. 1995). Möglicherweise kommt der Einfluss des Laufradlaufs auf das Ausmaß der Dystrophie erst nach längerer Laufperiode zur Ausprägung.

Insgesamt ist die Studienlage über die Wirksamkeit einer GS-Behandlung von Muskeldystrophien beim Menschen sehr viel eindeutiger als im Mausmodell. Eine Hauptursache für diese Diskrepanz ist wahrscheinlich die unterschiedliche Ausprägung der beiden Phänotypen. Obwohl der mdx-Muskel ebenso wie der eines DMD-Patienten lebenslang einem Degenerations-Regenerations-Zyklus unterworfen ist, haben mdx-Mäuse eine nahezu normale Lebenserwartung, während die der DMD-Patienten erheblich verkürzt ist. Bereits ältere Untersuchungen zeigten eine elektrisch gemessene Kraftentwicklung des mdx-Soleusmuskels, die der des Wildtypmuskels annähernd gleichkam (Coulton et al. 1988) und insgesamt wurde gezeigt, dass mdx-Mäuse kaum muskuläre Funktionseinschränkungen aufweisen (De Luca et al. 2003; Muntoni et al. 1993). Auch pathomorphologische Dystrophiezeichen sind im Vergleich zur DMD sehr viel weniger ausgeprägt (Torres und Duchon 1987). Dementsprechend zeigten mdx-Mäuse in der vorliegenden Arbeit zwar eine im Vergleich zu Wildtyptieren eingeschränkte Laufleistung, immerhin belief sich diese jedoch auf ca. 5 km pro 24h, eine Leistung, die ein gewisses Maß an

Muskelfunktion voraussetzt. Darüber hinaus zeigten mdx- und Wildtyp-Mäuse eine fast identische Griffkraftleistung. Aufgrund dieser Grundkonstellation sind Therapieeffekte bei der Behandlung der mdx-Maus unabhängig vom Medikament und dessen Wirksamkeit immer ungleich schwerer messbar als bei der DMD. Dieses ist auch der Grund dafür, dass in den meisten Arbeiten para-klinische Parameter zur Beurteilung der Effektivität verwendet wurden. Die Entwicklung eines Goldstandards bezüglich eines idealen „read-out“ Systems wird derzeit angestrebt (Grounds et al. 2008). Hierbei zeichnet sich ab, dass insbesondere die in dieser Arbeit verwendeten Laufraduntersuchungen mit unabhängiger und objektiver Datenerhebung international etabliert werden. Die Mäuse laufen ungestört und freiwillig und jegliche Laufaktivität wird mittels PC aufgezeichnet. Durch diese untersucherunabhängige (quasi verblindete) Messung wird ein Bias vermieden, der möglicherweise in Studien mit weniger objektiven Messverfahren vorhanden war. Zusätzlich können unterschiedliche Parameter unabhängig aufgezeichnet werden, was das Messspektrum weiterhin optimiert. Neben Standardparametern wie Gesamttagestrecke und Geschwindigkeit wurden vor allem auch die Anzahl, Strecke und Dauer der einzelnen Laufepisoden registriert und evaluiert. Dies bietet Rückschlüsse auf die Ausdauer und Ermüdbarkeit der Mäuse, die subtilere Therapieeffekte aufzeigen könnten. Damit spricht die Konsistenz der ermittelten Laufdaten für eine tatsächlich unzureichende Effektivität von GS in der Frühphase der Erkrankung. Darüber hinaus ist unsere Beobachtung vereinbar mit früheren Beschreibungen fehlender Prednisolon-Wirkung sowohl auf die in-vivo-Kraftentwicklung (De Luca et al. 2003) als auch auf in vitro gemessene Kontraktionskraft von Diaphragma (Yang et al. 1998) und Beinmuskel (Baltgalvis et al. 2009).

Zu den Indikatoren für eine kumulative Muskelzellschädigung zählen die Serum-CK und der CNI. Beide blieben in der vorliegenden Arbeit durch eine Prednisolon-Therapie unbeeinflusst. Der CK-Spiegel blieb auch in den bisher publizierten Studien typischerweise unbeeinflusst durch GS (Golumbek et al. 2007; Granchelli et al. 2000; Weller et al. 1991). Eine CNI-Verminderung durch GS konnte sowohl in der DMD (Hussein et al. 2006) als auch in der mdx-Maus beobachtet werden (Baltgalvis et al. 2009). In andere Arbeiten fand sich kein solcher Effekt (Anderson et al. 1996; Fisher et al. 2005; Weller et al. 1991). Es

ist bisher unzureichend geklärt, ob sich diese Schädigungsparameter überhaupt zur Beurteilung eines Therapieeffektes eignen.

Ein etablierter Indikator für den fibrotischen Umbau verschiedener Gewebe ist das Expressionsprofil des Zytokins TGF β (Bernasconi et al. 1995; Murakami et al. 1999). In dieser Arbeit wurde eine deutliche Überexpression von TGF β in der mdx-Maus demonstriert, die im Zwerchfell stärker ausgeprägt war als im Beinmuskel. Eine Reduktion der TGF β -Proteinmenge im Diaphragma durch eine GS-Behandlung von mdx-Mäusen ist vorbeschrieben (Hartel et al. 2001), jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit kein solcher Effekt einer GS-Therapie auf die mRNA Expression von TGF β im Bein- oder Zwerchfellmuskel demonstriert werden. Möglicherweise ist die Wirkung von GS auf TGF β auf posttranskriptionelle Prozesse beschränkt.

Die mRNA-Expression des Entzündungsmediators *spp1* war ebenfalls im Zwerchfell stärker hochreguliert als im Beinmuskel und blieb unbeeinflusst durch die Therapie mit PL oder Prednisolon. Verschiedene Experimente mit *spp1-knockout* Mäusen weisen dem Protein eine Gewebeumbaufunktion zu. So scheint es beispielsweise die Kollagensynthese und -akkumulation bei Wundheilungsprozessen zu beeinflussen (Liaw et al. 1998; Trueblood et al. 2001). Porter et al fanden bei DNA-Microarray-Analysen *spp1* unter den am stärksten überexprimierten Genen im Bein- und Zwerchfellmuskel (Porter et al. 2003; Porter et al. 2004). Da *spp1* unter anderem von Makrophagen sezerniert wird, deuten die Autoren diese Beobachtung als mögliche Verbindung zwischen Entzündung und fibrotischem Umbau. Da wir *spp1* vor allem im Zwerchfell hochreguliert fanden und in viel geringerem Maße im Beinmuskel und gleichzeitig im Zwerchfell kaum infiltrierte Makrophagen zu finden waren, können unsere Beobachtungen diese These nicht untermauern. Insgesamt fanden sich bei allen mRNA-Expressionsanalysen starke interindividuelle Schwankungen. Möglicherweise ist die differentielle Genexpression dieser bei der mdx-Maus hochregulierten Entzündungsmediatoren zu störanfällig und variabel, um Therapieeffekte hinreichend sicher zu erfassen.

Für die fehlende Wirkung liposomaler GS kommen darüber hinaus auch andere Erklärungsansätze in Betracht. Beobachtungen aus früheren Behandlungsexperimenten mit liposomalen GS liefern deutliche Hinweise auf eine Phagozytose-assoziierte Wirkungsweise insbesondere über

Makrophagen. Nach Injektion von Gold-markierten Liposomen in Ratten mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis und anschließender histologischer Darstellung fanden sich diese überwiegend innerhalb von Makrophagen (Schmidt et al. 2003). Überdies ist die Menge infiltrierter Makrophagen im betroffenen Gewebe nach Behandlung mit liposomalen im Vergleich zu freien GS sehr viel stärker reduziert (Linker et al. 2008). Es liegt auf der Hand, dass Makrophagen durch periphere Phagozytose und entzündungsgerichteten Transport zum „*drug-targeting*“ beitragen könnten. Darüber hinaus ist möglicherweise durch radikalere Makrophagen-Elimination die immunsuppressive Wirkung im Vergleich zu freien GS verstärkt. Da in der Pathogenese der mdx im Vergleich zu Modellerkrankungen von Multipler Sklerose oder Arthritis die inflammatorische Komponente und speziell die Invasion von Makrophagen in das betroffene Gewebe eine wesentlich geringere Rolle spielen, mag die Makrophagen-gerichtete antiinflammatorische Wirkung der liposomalen GS hier nicht hinreichend effektiv sein. Außerdem könnte mangels einer spezifischen Entzündung wie bei Autoimmunerkrankungen die Extravasation von Liposomen in den Muskel unzureichend sein, um entsprechend hohe GS-Spiegel im Muskel zu entwickeln. Interessanterweise ist sogar umstritten, ob Makrophagen in der Pathogenese der mdx eine ausschließlich schadende Rolle zukommt. So gibt es Hinweise, dass eingewanderte Makrophagen im geschädigten Muskel Regenerations- und Reparaturprozesse ankurbeln und das Muskelwachstum fördern (Tidball und Wehling-Henricks 2007). Unsere Beobachtung, dass der regenerationsdominierte Beinmuskel der mdx-Maus sehr viel mehr Makrophageninfiltrate aufwies als der Zwerchfellmuskel, in dem degenerative Prozesse überwiegen, ist mit dieser These vereinbar. Falls infiltrierten Makrophagen tatsächlich eine regenerative Funktion zukommt, könnte deren Elimination durch liposomal verpackte GS krankheitsfördernd wirken und den Makrophagen-unabhängigen kurativen GS-Effekten entgegenwirken. Im Allgemeinen gibt es über die Behandlung von Muskelerkrankungen mit liposomalen Medikamenten bisher keine Untersuchungen. Damit ist eine generelle Unwirksamkeit von liposomal verkapselten Medikamenten im Muskelgewebe zum Beispiel durch fehlende Oberflächenstrukturen, die die Extravasation erlauben, nicht auszuschließen.

Letztendlich steht die limitierte Wirksamkeit einer GS-Therapie bei der mdx-Maus grundsätzlich im Gegensatz zu deren etablierter Verwendung bei der Behandlung von DMD-Patienten. Trotz identischer Ätiologie und vermutlich ähnlicher Pathogenese ist die DMD eine tödliche Erkrankung mit progredientem Funktionsverlust der Muskulatur, während es bei der mdx-Maus nur zu partieller Funktionseinschränkung kommt, die keine Auswirkungen auf die Lebenserwartung hat. Diese Unterschiede limitieren die Anwendbarkeit dieses Modells für die DMD-Forschung.

5. Zusammenfassung

Die Behandlung der DMD mit GS als einzige derzeit etablierte Langzeitbehandlung wird durch schwerwiegende Nebenwirkungen limitiert. Mittels liposomaler Verkapselung von GS kann durch hohe lokale Wirkspiegel bei geringen systemischen Konzentrationen ein günstigeres Wirkungs-Nebenwirkungs-Profil erzielt werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Therapie von mdx-Mäusen mit liposomal verkapseltem Prednisolon zu untersuchen und mit der Behandlung mit freiem Prednisolon und Kontrollmäusen zu vergleichen. Beide Behandlungen zeigten keine Auswirkungen auf den klinischen Krankheitsverlauf, den dystrophischen Muskelumbau oder die Expression von Entzündungsmediatoren. Da Liposomen wahrscheinlich vorrangig über einen Makrophagen-abhängigen Mechanismus wirken, könnte die geringe inflammatorische Komponente in der Pathogenese der mdx-Maus deren Unwirksamkeit mit bedingen. Die limitierte Wirksamkeit von freien GS in der Therapie der mdx-Maus steht im Gegensatz zu deren erfolgreicher Anwendung in der Behandlung von DMD-Patienten, was einen Hinweis auf die Limitation dieses Tiermodells darstellen könnte. Die Ergebnisse stellen eine wesentliche Grundlage dar für zukünftige experimentelle Therapiestudien an der mdx-Maus und anderen Myopathiemodellen sowie deren computergestützte Verlaufsbeobachtung mittels Laufrädern.

6. Literaturverzeichnis

Anderson JE, McIntosh LM, Poettcker R (1996): Deflazacort but not prednisone improves both muscle repair and fiber growth in diaphragm and limb muscle in vivo in the mdx dystrophic mouse. *Muscle Nerve* 19, 1576 - 1585

Anderson JE, Weber M, Vargas C (2000): Deflazacort increases laminin expression and myogenic repair, and induces early persistent functional gain in mdx mouse muscular dystrophy. *Cell Transplant* 9, 551 - 564

Angelini C, Pegoraro E, Turella E, Intino MT, Pini A, Costa C (1994): Deflazacort in Duchenne dystrophy: study of long-term effect. *Muscle Nerve* 17, 386 - 391

Archer JD, Vargas CC, Anderson JE (2006): Persistent and improved functional gain in mdx dystrophic mice after treatment with L-arginine and deflazacort. *FASEB J* 20, 738 - 740

Baltgalvis KA, Call JA, Nikas JB, Lowe DA (2009): Effects of prednisolone on skeletal muscle contractility in mdx mice. *Muscle Nerve* 40, 443 - 54

Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, Brugnoli R, Barresi R, Mora M, Cornelio F, Morandi L, Mantegazza R (1995): Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J Clin Invest* 96, 1137 - 1144

Bizario JC, Cerri DG, Rodrigues LC, Oliveira GL, Nomizo A, de Araujo DD, Fukuhara PS, Ribeiro JC, de Castro FA, Costa MC (2009): Imatinib mesylate ameliorates the dystrophic phenotype in exercised mdx mice. *J Neuroimmunol* 212, 93 - 101

Brussee V, Tardif F, Tremblay JP (1997): Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. *Neuromuscul Disord* 7, 487 - 492

Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ (1984): X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1189 - 1192

Cattel L, Ceruti M, Dosio F (2004): From conventional to stealth liposomes: a new Frontier in cancer chemotherapy. *J Chemother* 16 Suppl 4, 94 - 97

Coulton GR, Curtin NA, Morgan JE, Partridge TA (1988): The mdx mouse skeletal muscle myopathy: II. Contractile properties. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14, 299 - 314

De Luca A, Pierno S, Liantonio A, Cetrone M, Camerino C, Fraysse B, Mirabella M, Servidei S, Ruegg UT, Conte CD (2003): Enhanced dystrophic progression in mdx mice by exercise and beneficial effects of taurine and insulin-like growth factor-1. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 453 - 463

- De Silva M, Hazleman BL, Thomas DP, Wraight P (1979): Liposomes in arthritis: a new approach. *Lancet* 1979,1, 1320 - 1322
- Deconinck N, Dan B (2007): Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol* 36, 1 - 7
- Denhardt DT, Lopez CA, Rollo EE, Hwang SM, An XR, Walther SE (1995): Osteopontin-induced modifications of cellular functions. *Ann N Y Acad Sci* 760, 127 - 142
- Dingle JT, Gordon JL, Hazleman BL, Knight CG, Page Thomas DP, Phillips NC, Shaw IH, Fildes FJ, Oliver JE, Jones G, Turner EH, Lowe JS (1978): Novel treatment for joint inflammation. *Nature* 271, 372 - 373
- Drachman DB, Toyka KV, Myer E (1974): Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 1974,2, 1409 - 1412
- Emery AE (2002): The muscular dystrophies. *Lancet* 359, 687 - 695
- Engel AG, Franzini-Armstrong C *Myology*, 3 edition; McGraw Hill Berkshire, 2004
- Fang J, Shi GP, Vaghy PL (2000): Identification of the increased expression of monocyte chemoattractant protein-1, cathepsin S, UPIX-1, and other genes in dystrophin-deficient mouse muscles by suppression subtractive hybridization. *J Cell Biochem* 79, 164 - 172
- Fisher I, Abraham D, Bouri K, Hoffman EP, Muntoni F, Morgan J (2005): Prednisolone-induced changes in dystrophic skeletal muscle. *FASEB J* 19, 834 - 836
- Franzen A, Heinegard D (1985): Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* 232, 715 - 724
- Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, Martin F, Huang A, Barenholz Y (1994): Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res* 54, 987 - 992
- Golumbek PT, Keeling RM, Connolly AM (2007): Strength and corticosteroid responsiveness of mdx mice is unchanged by RAG2 gene knockout. *Neuromuscul Disord* 17, 376 - 384
- Gosselin LE, Williams JE, Deering M, Brazeau D, Koury S, Martinez DA (2004): Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve* 30, 645 - 653
- Granchelli JA, Pollina C, Hudecki MS (2000): Pre-clinical screening of drugs using the mdx mouse. *Neuromuscul Disord* 10, 235 - 239
- Gregoriadis G, Leathwood PD, Ryman BE (1971): Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett* 14, 95 - 99

- Gregoriadis G, Wills EJ, Swain CP, Tavill AS (1974): Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. *Lancet* 1974,1, 1313 - 1316
- Griggs RC, Moxley RT, III, Mendell JR, Fenichel GM, Brooke MH, Pestronk A, Miller JP (1991): Prednisone in Duchenne dystrophy. A randomized, controlled trial defining the time course and dose response. *Clinical Investigation of Duchenne Dystrophy Group. Arch Neurol* 48, 383 - 388
- Grounds MD, Radley HG, Lynch GS, Nagaraju K, De Luca A (2008): Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol Dis* 31, 1 - 19
- Gu L, Tseng SC, Rollins BJ (1999): Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem Immunol* 72, 7 - 29
- Hartel JV, Granchelli JA, Hudecki MS, Pollina CM, Gosselin LE (2001): Impact of prednisone on TGF-beta1 and collagen in diaphragm muscle from mdx mice. *Muscle Nerve* 24, 428 - 432
- Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM (1992): Dystrophin: the protein product of the Duchene muscular dystrophy locus. 1987. *Biotechnology* 24, 457 - 466
- Hussein MR, Hamed SA, Mostafa MG, Abu-Dief EE, Kamel NF, Kandil MR (2006): The effects of glucocorticoid therapy on the inflammatory and dendritic cells in muscular dystrophies. *Int J Exp Pathol* 87, 451 - 461
- Karpati G, Carpenter S, Prescott S (1988): Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer necrosis in mdx mouse dystrophy. *Muscle Nerve* 11, 795 - 803
- Keeling RM, Golumbek PT, Streif EM, Connolly AM (2007): Weekly oral prednisolone improves survival and strength in male mdx mice. *Muscle Nerve* 35, 43 - 48
- Kissel JT, Burrow KL, Rammohan KW, Mendell JR (1991): Mononuclear cell analysis of muscle biopsies in prednisone-treated and untreated Duchenne muscular dystrophy. *CIDD Study Group. Neurology* 41, 667 - 672
- Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, Kaariainen H, . (1989): The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 45, 498 - 506
- Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BL (1998): Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest* 101, 1468 - 1478
- Liebetanz D, Hagemann K, von Lewinski F, Kahler E, Paulus W (2004): Extensive exercise is not harmful in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 20, 3115 - 3120
- Lim JH, Kim DY, Bang MS (2004): Effects of exercise and steroid on skeletal muscle apoptosis in the mdx mouse. *Muscle Nerve* 30, 456 - 462

- Linker RA, Weller C, Luhder F, Mohr A, Schmidt J, Knauth M, Metselaar JM, Gold R (2008): Liposomal glucocorticosteroids in treatment of chronic autoimmune demyelination: long-term protective effects and enhanced efficacy of methylprednisolone formulations. *Exp Neurol* 211, 397 - 406
- Love WG, Amos N, Kellaway IW, Williams BD (1990): Specific accumulation of cholesterol-rich liposomes in the inflammatory tissue of rats with adjuvant arthritis. *Ann Rheum Dis* 49, 611 - 614
- Matsumura K, Ohlendieck K, Ionasescu VV, Tome FM, Nonaka I, Burghes AH, Mora M, Kaplan JC, Fardeau M, Campbell KP (1993): The role of the dystrophin-glycoprotein complex in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 3, 533 - 535
- Metselaar JM, Mastrobattista E, Storm G (2002) Liposomes for intravenous drug targeting: design and applications. *Mini Rev Med Chem* 2, 319 - 329
- Metselaar JM, Wauben MH, Wagenaar-Hilbers JP, Boerman OC, Storm G (2003): Complete remission of experimental arthritis by joint targeting of glucocorticoids with long-circulating liposomes. *Arthritis Rheum* 48, 2059 - 2066
- Metzinger L, Passaquin AC, Warter JM, Poindron P (1993): alpha-Methylprednisolone promotes skeletal myogenesis in dystrophin-deficient and control mouse cultures. *Neurosci Lett* 155, 171 - 174
- Muntoni F, Mateddu A, Marchei F, Clerk A, Serra G (1993): Muscular weakness in the mdx mouse. *J Neurol Sci* 120, 71 - 77
- Murakami N, McLennan IS, Nonaka I, Koishi K, Baker C, Hammond-Tooke G (1999): Transforming growth factor-beta2 is elevated in skeletal muscle disorders. *Muscle Nerve* 22, 889 - 898
- Okano T, Yoshida K, Nakamura A, Sasazawa F, Oide T, Takeda S, Ikeda S (2005): Chronic exercise accelerates the degeneration-regeneration cycle and downregulates insulin-like growth factor-1 in muscle of mdx mice. *Muscle Nerve* 32, 191 - 199
- Oku N, Namba Y (1994): Long-circulating liposomes. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 11, 231 - 270
- Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL (1993): Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3710 - 3714
- Porter JD, Merriam AP, Leahy P, Gong B, Khanna S (2003): Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (mdx) mice. *Hum Mol Genet* 12, 1813 - 1821
- Porter JD, Merriam AP, Leahy P, Gong B, Feuerman J, Cheng G, Khanna S (2004): Temporal gene expression profiling of dystrophin-deficient (mdx)

mouse diaphragm identifies conserved and muscle group-specific mechanisms in the pathogenesis of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 13, 257 - 269

Rahman YE, Rosenthal MW, Cerny EA, Moretti ES (1974): Preparation and prolonged tissue retention of liposome-encapsulated chelating agents. *J Lab Clin Med* 83, 640 - 647

Rando TA (2001): The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24, 1575 - 1594

Sandri M, Carraro U, Podhorska-Okolov M, Rizzi C, Arslan P, Monti D, Franceschi C (1995): Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. *FEBS Lett* 373, 291 - 295

Schmidt J, Metselaar JM, Wauben MH, Toyka KV, Storm G, Gold R (2003): Drug targeting by long-circulating liposomal glucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a model of multiple sclerosis. *Brain* 126, 1895 - 1904

St Pierre SJ, Chakkalakal JV, Kolodziejczyk SM, Knudson JC, Jasmin BJ, Megeney LA (2004): Glucocorticoid treatment alleviates dystrophic myofiber pathology by activation of the calcineurin/NF-AT pathway. *FASEB J* 18, 1937 - 1939

Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, Narusawa M, Leferovich JM, Sladky JT, Kelly AM (1991): The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352, 536 - 539

Tidball JG, Wehling-Henricks M (2007): Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J Physiol* 578, 327 - 336

Torres LF, Duchon LW (1987): The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain* 110, II, 269 - 299

Trueblood NA, Xie Z, Communal C, Sam F, Ngoy S, Liaw L, Jenkins AW, Wang J, Sawyer DB, Bing OH, Apstein CS, Colucci WS, Singh K (2001): Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. *Circ Res* 88, 1080 - 1087

Weber GF, Cantor H (1996): The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 241 - 248

Wehling-Henricks M, Lee JJ, Tidball JG (2004): Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 14, 483 - 490

- Weller B, Massa R, Karpati G, Carpenter S (1991): Glucocorticoids and immunosuppressants do not change the prevalence of necrosis and regeneration in mdx skeletal muscles. *Muscle Nerve* 14, 771 - 774
- Woodle MC, Lasic DD (1992): Sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1113, 171 - 199
- Woodle MC, Newman MS, Cohen JA (1994): Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties. *J Drug Target* 2, 397 - 403
- Yang L, Luo J, Petrof BJ (1998): Corticosteroid therapy does not alter the threshold for contraction-induced injury in dystrophic (mdx) mouse diaphragm. *Muscle Nerve* 21, 394 - 397

Danksagungen

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. M. Bähr herzlich danken, der die Durchführung dieses Projektes ermöglichte und für optimale Arbeitsbedingungen sorgte.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. J. Schmidt für jahrelange immerwährende Unterstützung und Hilfe, die weit über diese Arbeit hinausging.

Weiterhin möchte ich Herrn PD Dr. med. D. Liebetanz danken, der mir freundlicherweise die Nutzung der Laufräder ermöglichte und Herrn Dr. med. F. Klinker und P. Dowling für technische Unterstützung in Laufrad-Angelegenheiten.

Herzlicher Dank gilt außerdem Herrn J. Metselaar für die zuverlässige Bereitstellung der Liposomen.

Ich danke A. Wrede für die fachkundige Hilfe bei der Gewebeverarbeitung, Dr. L. Klinge für die kritische Durchsicht des Manuskriptes, A. Bohl und N. Tasche für technische Unterstützung und allen Institutskollegen für ihre konstante Hilfsbereitschaft und ein tolles Arbeitsklima.

Zuletzt danke ich meinen Eltern für finanzielle Unterstützung und meinem Freund D. Schwarten für computertechnische Hilfe.

Lebenslauf

Ich, Charlotte Helene Elisabeth Weller, wurde am 09.05.1982 als Tochter von Dr. rer. nat. Michael Weller geb. Girth und Dr. med. Christine Weller in Tübingen geboren. Ich besuchte die Dalberg-Grundschule und anschließend das Carl-Benz-Gymnasium in Ladenburg. Im August 2000 zog ich aus privaten Gründen mit meiner Familie nach New York, USA und besuchte dort für ein weiteres Jahr die Deutsche Schule New York. Dort bestand ich mit einer Durchschnittszensur von 1,4 das deutsche Abitur und erlangte somit die Hochschulreife. Anschließend begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen, wo ich den vorklinischen Teil im September 2003 mit bestandenem Physikum erfolgreich abschloss. Von Oktober 2004 bis März 2006 unterbrach ich das Medizinstudium und studierte molekulare Biologie im Rahmen eines internationalen MSc/PhD Programms der International Max Planck Research School an der Universität Göttingen. Nach Abschluss einer Masterarbeit am Institut für Multiple Sklerose Forschung unter der Leitung von Prof. Dr. med. R. Gold beendete ich das Studium der molekularen Biologie im April 2006 mit dem Master of Science. Im direkten Anschluss nahm ich das Studium der Humanmedizin wieder auf und begann im Juni 2006 mit einer Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Muskelimmunbiologie von PD Dr. med. J. Schmidt an der Abteilung Neurologie, geleitet von Prof. Dr. med. M. Bähr. Im Mai 2009 schloss ich das Studium der Humanmedizin mit bestandenem Staatsexamen erfolgreich ab.