

**Quantitativ-morphologische und funktionelle
Untersuchungen der Hypophyse in einem
porzinen Modell der Duchenne-Muskeldystrophie**

von Isabel Felicia Hofmann, geb. Fleischer

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Quantitativ-morphologische und funktionelle
Untersuchungen der Hypophyse in einem
porzinen Modell der Duchenne-Muskeldystrophie**

von Isabel Felicia Hofmann, geb. Fleischer

aus München

München 2020

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Mitbetreuung durch:

Priv.-Doz. Dr. Andreas Parzefall

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Manfred Gareis

Prof. Dr. Armin M. Scholz

Univ. Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Joachim Gabius

Univ. Prof. Dr. Holm Zerbe

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND.....	5
2.1	Wachstumshormon/Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1- System	5
2.1.1	Somatotrope Achse.....	7
2.1.2	Somatotrope Zellen in der Adenohypophyse	10
2.1.3	Wachstumshormon	15
2.1.4	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1.....	20
2.2	Duchenne-Muskeldystrophie (DMD).....	25
2.2.1	Pathogenese, Krankheitsverlauf und Therapie der DMD	26
2.2.2	Wachstumsstörungen bei DMD-Patienten	33
2.2.3	Zusammenhang zwischen Wachstumsstörungen und dem Krankheitsverlauf von DMD-Patienten	36
2.2.4	Therapeutischer Einsatz von Wachstumshormon und Wachstumshormon-Antagonisten bei DMD-Patienten	38
2.2.5	DMD-Tiermodelle	41
2.2.5.1	DMD-Nagermodelle	41
2.2.5.2	DMD-Hunde- und Katzenmodelle	43
2.2.5.3	DMD-Kaninchenmodell	44
2.2.5.4	DMD-Schweinmodell.....	45
2.3	Quantitative Stereologie.....	47
2.3.1	Quantitativ-stereologische Analyse biologischer Gewebeproben	48
2.3.2	Stereologische Prinzipien und Strukturparameter	50
2.3.3	Grundlagen des physikalischen Disektorverfahrens	55
3	PUBLIKATION.....	57
4	DISKUSSION.....	75
4.1	Grundlagen und Ziele der vorliegenden Arbeit	75
4.2	Eignung des porzinen DMD-Modells zur Untersuchung von hypophysären Alterationen	79

4.3	Eignung der eingesetzten Verfahren zur Ermittlung quantitativ-morphologischer Parameter der Hypophyse	81
4.4	Vergleich der unterschiedlichen quantitativ-morphologischen Befunde der Adenohypophyse im porzinen DMD-Modell und im kaninen GRMD-Modell.....	85
4.4.1	Speziesspezifische Unterschiede der untersuchten Tiermodelle	90
4.4.2	Methodische Unterschiede der angewandten quantitativ-stereologischen Analyseverfahren	92
4.4.3	Mögliche Ursachen für eine verringerte absolute Anzahl somatotroper Zellen in der Adenohypophyse von DMD-Schweinen	96
4.5	Erklärungsansätze für Wachstumsstörungen bei humanen DMD-Patienten jenseits einer strukturellen Veränderung der Adenohypophyse	97
4.6	Ausblick.....	101
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	103
6	SUMMARY	107
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	111
8	LITERATURVERZEICHNIS	113
9	EIGENE PUBLIKATIONEN UND BEITRÄGE AUF WISSENSCHAFTLICHEN KONGRESSEN	149
10	DANKSAGUNG.....	151

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAV	Adeno-assoziierte Viren
ACE	Angiotensin Converting Enzyme / Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
AKT	Serin/Threonin-Kinase
ALS	Acid labile subunit / Säure labile Untereinheit
AON	Antisense Oligonukleotide
BAC	Bacterial artificial chromosome / Künstliches Bakterien-Chromosom
BMD	Becker-Muskeldystrophie
BMI	Body-Mass-Index / Körpermassenindex
CK	Creatine kinase / Kreatinkinase
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats / gehäuft auftretende, regelmäßig unterbrochene, kurze Palindrom Wiederholungen
DAB	Diaminobenzidin
DGC	Dystrophin-Glykoprotein-Komplex
DMD	Duchenne-Muskeldystrophie
Dp	Dystrophin Isoform
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay / Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GHBP	Growth hormone binding protein / GH-Bindungsprotein

GHD	Growth hormone deficiency / GH-Defizienz
GH	Growth hormone / Wachstumshormon
GHI	Growth hormone insensitivity / GH-Insensitivität
GHR	GH-Rezeptor
GHRH	Growth hormone releasing hormone / Somatoliberin
GHRHR	GHRH-Rezeptor
GRMD	Golden Retriever Muskeldystrophie
HE	Hämatoxylin und Eosin
HRP	Horseradish peroxidase / Meerrettichperoxidase
IGF1	Insulin-like growth factor 1 / Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
IGF1R	IGF1-Rezeptor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein / IGF-Bindungsprotein
IGFBPrP	Insulin-like growth factor binding protein related protein / mit IGFBP verwandte Proteine
IR	Insulin Rezeptor
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
IUR	Isotropic uniform random / ungerichtet mit gleichförmiger Zufälligkeit
JAK2	Januskinase 2
KO	Knock out / Ausschaltung eines spezifischen Gens
LAMP	Lysosome-associated membrane protein / Lysosom-assoziiertes Membranprotein
L-Dopa	Levodopa
LH	Luteinisierendes Hormon

MAPK	Mitogen-activated protein kinase / Mitogen-aktivierte Proteinkinase (Serin/Threonin-Kinase)
MDX	Murine X-chromosome-linked muscular dystrophy Mausmodell der DMD
MRT	Magnetresonanztomografie
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
MSOT	Multispektrale optoakustische Tomografie
nNOS	Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase
mTOR	Mechanistic target of rapamycin / Ziel des Rapamycins
PEG	Polyethylenglykol
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
POMC	Proopiomelanocortin
PRL	Prolaktin
RIA	Radioimmunoassay / Radioimmunologische Testmethode
SCNT	Somatic cell nuclear transfer / Kerntransfer
SIH	Somatotropin inhibiting hormone / Somatostatin
SHOX	Short stature homeobox / Homöobox-Gen, dessen Defekt phänotypisch Minderwuchs auslöst
SMA	Spinale Muskelatrophie
SNAP25	Synaptosomal nerve-associated protein 25 / Synaptosomales Nerven-assoziiertes Protein 25
SNARE	N-Ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor / N-Ethylmaleinimid-sensitiver-Faktor-Bindungsrezeptor

STAT	Signal transducers and activators of transcription / Signalübermittler und Aktivatoren der Transkription
SUR	Systematic uniform random / systematisch-zufällig
TALEN	Transcription activator-like effector nucleases / Transkriptionsaktivatorartige Effektornukleasen
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
VUR	Vertical Uniform Random / vertikal mit gleichförmiger Zufälligkeit

1 EINLEITUNG

Bei der Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) handelt es sich um eine schwere, X-chromosomale Erbkrankheit, die bei etwa einem von 3500 männlichen Neugeborenen auftritt [1–3]. Der Verlust der Funktionsfähigkeit des Muskelfasermembranproteins „Dystrophin“ führt bei den Patienten zu einer progressiven Muskelschwäche, die mit dem Verlust der Geh- und Stehfähigkeit einhergeht und in einer reduzierten Lebenserwartung der Patienten durch Atem- oder Herzversagen resultiert [4,5]. Da sich fast alle kurativen Therapieansätze für die Erkrankung noch in der Entwicklungsphase befinden [6,7], stehen den meisten Betroffenen derzeit lediglich symptomatische Behandlungsansätze zur Verfügung, unter anderem mit Kortikosteroiden, die den progressiven Verlauf der Erkrankung abmildern [8–11].

Kleinwüchsigkeit ist ein häufiges Phänomen bei DMD-Patienten, das bis zu 30 % der Patienten betrifft [12–14] und zusätzlich regelmäßig als eine der Nebenwirkungen, der Kortikosteroidbehandlung auftritt [12,15,16]. Die Ursachen für das gehäufte initiale Auftreten von Kleinwüchsigkeit bei DMD-Patienten sind ebenso wie ein möglicher Effekt auf den Krankheitsverlauf weitgehend ungeklärt [16]. Neben einer eingeschränkten Mobilität und einer erhöhten Stoffwechselrate, ausgelöst durch andauernde Degenerations- und Regenerationsprozesse der Muskelfasern, wird seit geraumer Zeit auch eine Beteiligung des Wachstumshormon (GH)/Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGF1)-Systems diskutiert [13,16,17]. Dies spiegelt sich auch in der kontroversen Studienlage zum therapeutischen Einsatz von rekombinantem humanem Wachstumshormon einerseits und Wachstumshormonantagonisten andererseits, bei DMD-Patienten wider. In einzelnen Studien konnten positive Effekte in Form einer teilweise länger anhaltenden Geh- und Stehfähigkeit von DMD-Patienten im Anschluss an eine Behandlung mit Wachstumshormonantagonisten (wie beispielsweise „Mazindol“), nachgewiesen werden [18–20]. Als Ursache hierfür kommen die positiven Effekte einer verringerten Belastung der dystrophen Muskeln, durch eine Reduktion der Körpergröße in Kombination mit einem geringeren Körpergewicht, in Betracht [21,22]. Andere Studien hingegen zeigten keine schädliche Wirkung einer Wachstumshormonadministration im Hinblick auf die klinische Symptomatik von DMD-Patienten und konnten zum Teil sogar

günstige Effekte dieser therapeutischen Intervention nachweisen. Wachstumshormon wird bei DMD-Patienten unter anderem zur Kompensation der Nebeneffekte der Kortikosteroidbehandlung (z.B. von Kleinwüchsigkeit und Fettleibigkeit) [23,24], oder zu einer allgemeinen Verbesserung der Herzfunktion eingesetzt [25].

Zur translationalen Erforschung der Pathogenese der Duchenne-Muskeldystrophie und zur Entwicklung neuartiger Therapieansätze für DMD-Patienten [7] wurden verschiedene Tiermodelle generiert [26]. Hierbei kommt neben den etablierten murinen und kaninen Tiermodellen [27] neuen, genetisch maßgeschneiderten Tiermodellen, wie dem 2013 publizierten porzinen Großtiermodell der Erkrankung [28] eine besondere Bedeutung zu [28,29]. Im Vergleich zur menschlichen DMD-Erkrankung weisen die verschiedenen Tiermodelle Unterschiede im Hinblick auf den Mutationstyp, die Ausprägung klinischer Symptome und die charakteristischen histopathologischen Veränderungen auf [26,27].

Während bei an DMD erkrankten Menschen quantitativ-morphologische Daten zu strukturellen Parametern des GH/IGF1-Systems weitgehend fehlen, existiert eine quantitativ-morphologische Studie von de Lima *et al.* aus dem Jahr 2007 [30] im Golden Retriever Modell (GRMD) der Erkrankung [31]. Die Autoren dieser Studie wiesen bei muskeldystrophen Hunden des GRMD-Modells eine Volumenzunahme der somatotropen, Wachstumshormon (GH) produzierenden Zellen im Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse), bedingt durch eine Volumenzunahme ihrer intrazellulär enthaltenen Wachstumshormongranula (GH-Granula) nach und folgerten daraus eine gestörte Wachstumshormonsekretion [30].

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der quantitativ-morphologischen Untersuchung hypophysärer Alterationen in einem porzinen Modell der Duchenne-Muskeldystrophie. Hierzu wurden umfangreiche quantitativ-morphologische Parameter der Adenohypophyse, wie zum Beispiel die absolute Anzahl und das mittlere Volumen somatotroper Zellen sowie das Volumen ihrer intrazellulären GH-Granula auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene, von DMD-Tieren und gleichaltrigen Kontrolltieren, erfasst und miteinander verglichen.

Zusätzlich zur Quantifizierung morphologischer Parameter wurden in beiden Gruppen funktionelle Parameter wie Serumkonzentrationen von GH und IGF1 sowie die GH-Abundanz in der Adenohypophyse ermittelt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen und die möglichen Ursachen für die Unterschiede im Vergleich zum GRMD-Modell der Duchenne-Muskeldystrophie wurden 2020 in der Fachzeitschrift „*Growth Hormone & IGF Research*“ veröffentlicht (siehe Abschnitt 3 Publikation) [32].

2 WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND

2.1 Wachstumshormon/Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1-System

Wachstums- und Differenzierungsprozesse werden im Körper durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener lokaler und systemischer Faktoren eng reguliert, dies ermöglicht eine feine Abstimmung auf den metabolischen Bedarf eines Organismus [33,34]. Bis heute ist die Regulation von Wachstumsprozessen und das Zusammenwirken einzelner daran beteiligter Komponenten nicht vollständig geklärt [35]. Eine zentrale Rolle spielt das Wachstumshormon, *Growth hormone* (GH)/Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1, *Insulin-like growth factor 1*, (IGF1)-System. Im Zentrum des GH/IGF1-Systems stehen die somatotropen, GH-produzierenden Zellen des Hypophysenvorderlappens (Adenohypophyse, *Pars distalis*) (siehe Abschnitt 2.1.2). Verschiedene Wirkungen von GH werden nicht nur direkt, sondern auch indirekt über die Produktion von IGF1 vermittelt [34,36,37]. Die Ausschüttung von IGF1 wird durch GH stimuliert. Obwohl nahezu alle Organe zur Bildung von IGF1 in der Lage sind, entstammt der mengenmäßig größte Anteil, des im Serum messbaren, endokrin wirksamen IGF1, der Leber [38–41]. Interessanterweise wird die GH-abhängige Wirkung von IGF1 überwiegend para- und autokrin an die jeweiligen Zielgewebe vermittelt [34,37]. Unter physiologischen Bedingungen wird das GH/IGF1-System durch zahlreiche Wechselwirkungen und Rückkopplungsmechanismen einzelner Komponenten reguliert (siehe Abschnitt 2.1.1 und 2.1.3). Die pulsatile Ausschüttung von GH aus der Hypophyse in die Zirkulation folgt einer geschlechtsspezifischen und zirkadianen Rhythmik [42–45] (siehe Abschnitt 2.1.1). Die Komplexität des feinabgestimmten GH/IGF1-Systems wird zusätzlich durch das Zusammenspiel verschiedener Komponenten erhöht. Hierzu zählen die Rezeptoren der jeweiligen Wachstumsfaktoren, der GH-Rezeptor (GHR) und der IGF1-Rezeptor (IGF1R), das GH-Bindungsprotein (GHBP) und die IGF-Bindungsproteine 1-6 (IGFBP1-6), mit regulatorischen und eigenständigen Funktionen sowie die mit den IGFBP verwandten Bindungsproteine, *IGFBP-related proteins* (IGFBPrPs) [36,46,47] (siehe Abschnitt 2.1.3 und 2.1.4).

Bei zahlreichen Krankheitsprozessen konnte eine pathogenetisch relevante Bedeutung des GH/IGF1-Systems nachgewiesen werden [48] zum Beispiel bei chronischen Nieren- und Darmerkrankungen sowie bei Tumorerkrankungen [37,49–52] (siehe Abschnitt 2.1.4). Im Weiteren werden daher wichtige Komponenten des GH/IGF1-Systems und deren Funktionen vorgestellt.

2.1.1 Somatotrope Achse

Die Hirnanhangsdrüse (Hypophyse) besteht im Wesentlichen aus drei verschiedenen Komponenten, der Adenohypophyse (*Pars distalis*), der *Pars intermedia* und der Neurohypophyse (*Pars nervosa*) [53]. Die pulsatile Freisetzung von in somatotropen Zellen produziertem und gespeichertem GH aus der Adenohypophyse, wird unter anderem durch den Hypothalamus reguliert. Dieses der Hypophyse übergeordnete Steuerungszentrum (Hypothalamus-Hypophysenachse) induziert beziehungsweise hemmt maßgeblich die Sekretion von Wachstumshormon durch die Ausschüttung von Somatoliberin, *Growth Hormone Releasing Hormone* (GHRH) beziehungsweise Somatostatin, *Somatotropin inhibiting hormone* (SIH) [47,54].

Zusätzlich spielen periphere Einflüsse wie Schlaf, Bewegung und Ernährung eine wichtige Rolle bei der Regulation der GH-Ausschüttung [43,55,56]. Neben der Menge der GH-Sekretion, ist das Muster seiner pulsatilen Ausschüttung (GH-Pulsfrequenz und Amplitudenhöhe) entscheidend für zahlreiche physiologische Effekte und trägt zur gewebsspezifischen Divergenz der GH-Wirkung bei [44]. Dieses Muster wird weitgehend über Impulse aus dem Hypothalamus reguliert und weist zum Teil erhebliche geschlechtsspezifische und speziesspezifische Unterschiede auf [44]. Beim Menschen haben Schlaf und Ernährungszustand einen großen Einfluss auf die pulsatile GH-Sekretion [42,43]. Schwankungen in der circadianen Rhythmik sind beispielsweise bei männlichen Schweinen, im Vergleich zu weiblichen Tieren oder kastrierten Tieren, deutlicher ausgeprägt [57].

Ghrelin, ein im Magen produziertes Peptid, stimuliert die Ausschüttung von GH auf hypothalamischer und hypophysärer Ebene, wohingegen freie Fettsäuren in der Lage sind, die GH-Ausschüttung zu hemmen. Dies geschieht einerseits indirekt, durch die Ausschüttung von SIH und andererseits durch die direkte inhibitorische Wirkung an somatotropen Zellen [44,47,58]. Leptin aus Fettzellen wird ebenfalls eine regulatorische Funktion auf die GH-Sekretion zugeschrieben, wobei seine stimulatorischen und inhibitorischen Effekte noch kontrovers diskutiert werden [59–61]. Gleichwohl scheint die neuroendokrine GH-Ausschüttung eng mit der Energiebilanz des Organismus verknüpft zu sein [44,45] (Abbildung 1).

Die Effekte des in die Zirkulation freigesetzten GH beinhalten neben einigen direkten [37,48] auch zahlreiche indirekte Effekte, die durch IGF1 an die Zielgewebe (zum Beispiel Knochen und Muskeln) vermittelt werden [34,36,37,55,62,63] (siehe Abschnitt 2.1.3). Innerhalb der, dem Hypothalamus nachgeschalteten, GH/IGF1-Achse kommt es nach GH-Stimulation in zahlreichen Organen zur Bildung und Ausschüttung von IGF1 [34,58,64]. Die Leber ist hierbei für den mengenmäßig größten Anteil der IGF1-Produktion verantwortlich und damit die größte Quelle von im Blut zirkulierenden, endokrin wirksamen, IGF1 [40,41]. Die wichtigere funktionelle Bedeutung kommt hingegen, dem in den meisten Organen gebildeten, auto- und parakrin wirksamen, IGF1 zu [34,36,37,58,63]. Dies hat zur Folge, dass die lokale Produktion von IGF1 und seine lokale Interaktion mit dem IGF1R einen maßgeblichen Einfluss auf das Längenwachstum der langen Röhrenknochen und auf die Regulation der Muskelmasse haben [34,37,54,65,66] (siehe Abschnitt 2.1.4 und Abbildung 1).

Die Regulation der GH-Produktion und -Sekretion wird eng über negative Rückkopplungsmechanismen gesteuert [55,67]. Das in den lokalen und peripheren Zielgeweben als Konsequenz der GH-Wirkung produzierte und freigesetzte IGF1 wirkt in einer negativen Rückkopplungsschleife hemmend auf die GH-Ausschüttung indem eine hohe Konzentration von freiem, nicht an IGF-Bindungsproteine (IGFBP) gebundenen IGF1, auf endokrine Weise sowohl die GHRH-Sekretion im Hypothalamus als auch die GH-Sekretion aus der Adenohypophyse unterdrückt und gleichzeitig die SIH-Sekretion aus dem Hypothalamus anregt [58]. Zusätzlich wird die somatotrope Achse durch einen eigenen, von GH selbst induzierten Rückkopplungsmechanismus, beeinflusst. GH wirkt in ähnlicher Weise wie IGF1, negativ auf seine eigene Ausschüttung, allerdings in einer kürzeren Rückkopplungsschleife auf hypothalamischer Ebene durch die Hemmung von GHRH und die Stimulation von SIH [44]. Es gibt außerdem Hinweise auf die Existenz eines auto- und parakrin vermittelten Autoregulationsmechanismus von GH auf seine eigene Produktion und Sekretion auf hypophysärer Ebene im Rahmen einer direkten Rückkopplungsschleife [68,69] (Abbildung 1).

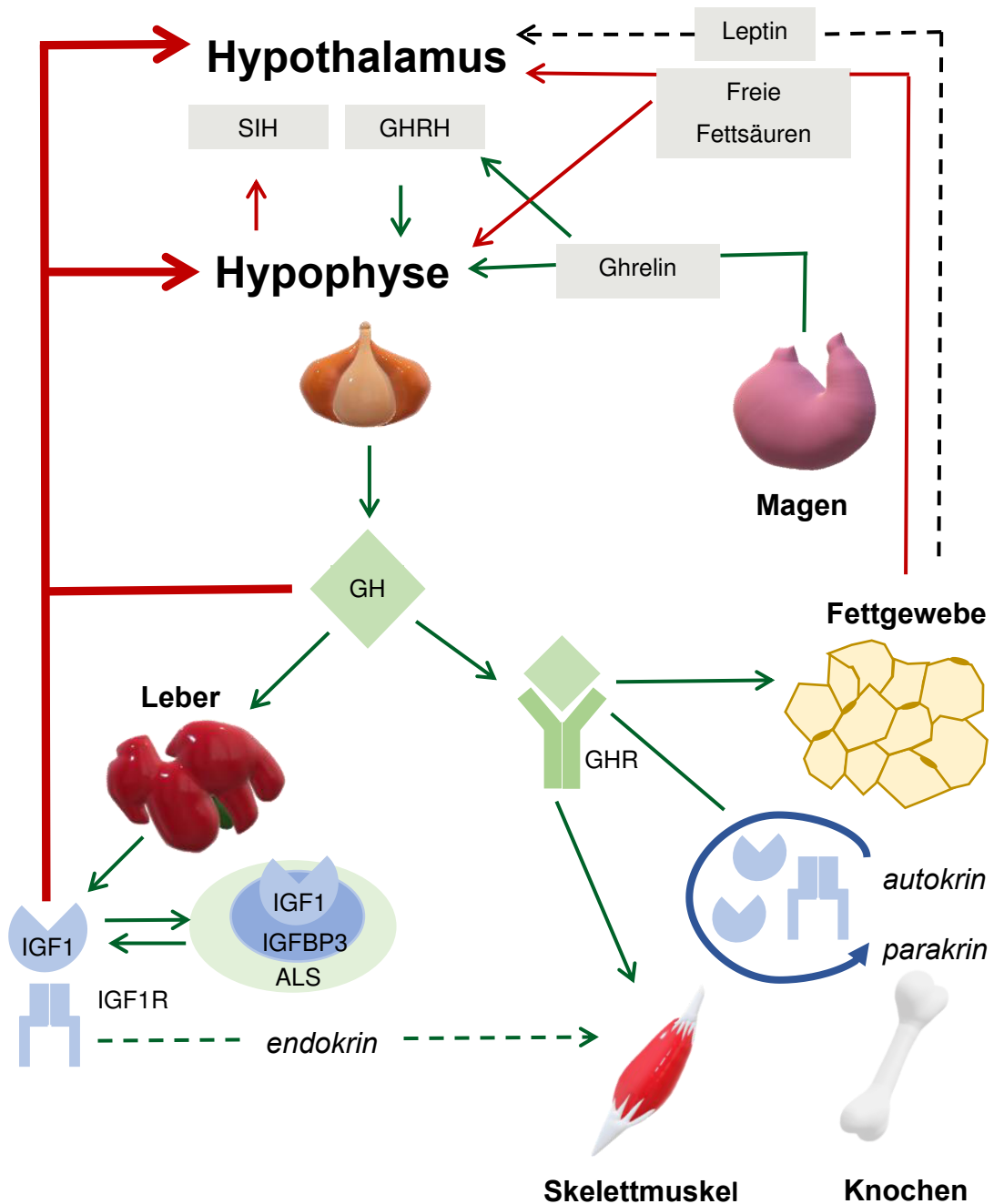


Abbildung 1: Schematische Darstellung der somatotropen Achse. Die Produktion und pulsatile Freisetzung von GH aus den somatotropen Zellen der Adenohypophyse wird durch GHRH und SIH im Hypothalamus stimuliert, beziehungsweise gehemmt. In die Zirkulation freigesetztes GH stimuliert in der Leber und anderen Zielgeweben die Produktion von IGF1. Einige wichtige GH-Effekte werden indirekt, auto- beziehungsweise parakrin über IGF1 vermittelt. Abbildung: Isabel Hofmann 2020.

2.1.2 Somatotrope Zellen in der Adenohypophyse

Die Hypophyse stellt eine wichtige Verbindungsstelle zwischen dem zentralen Nervensystem und dem endokrinen System dar [70]. Embryologisch entwickelt sich die Hypophyse aus dem Ektoderm, welches die beiden Hauptkomponenten des Organs bildet. Der größere Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse, *Pars distalis*) entsteht ebenso wie der Zwischenlappen (*Pars intermedia*) aus einer Ausbuchtung des oralen Ektoderms (Rathke'sche Tasche). Der Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse) und der Hypophysenstiel (*Infundibulum*) entstehen aus dem Neuroektoderm, einer Ausstülpung des Zwischenhirns. Der Hypophysenstiel stellt nach Verschmelzung des Hypophysenhinterlappens mit der Adenohypophyse zur Gesamthypophyse die Verbindung zwischen Hypophyse und Gehirn dar [47,53,70,71].

Das Gewicht und die Größe der Hypophyse sind tierartsspezifisch unterschiedlich und neben dem Alter auch abhängig von Geschlecht und Trächtigkeits- beziehungsweise Laktationsstatus. Bei ausgewachsenen Hausschweinen besitzt die Hypophyse ein Gewicht von ca. 0,1 - 0,2 g [53]. Anatomisch steht die Hypophyse als Hirnanhangdrüse in enger Verbindung zum Hypothalamus und dessen Kernbereichen: *Tuber cinereum*, *Nucleus supraopticus* und *Nucleus paraventricularis*. Die Faserverbindungen des *Tractus tuberoinfundibularis* und des *Tractus supraoptico-* beziehungsweise *paraventriculohypophysyseus* laufen über das *Infundibulum* zur Neurohypophyse. Diese Verbindung erlangt funktionelle Bedeutung, da die Kerne des Hypothalamus Antidiuretisches Hormon (ADH, Vasopressin) und Oxytocin bilden, die durch anterograden, axonalen Transport in die Neurohypophyse gelangen, wo sie gespeichert und ausgeschüttet werden und schließlich über die Blutbahn zu den Zielorganen gelangen [53,72,73].

Anatomisch befindet sich die Hypophyse an der Schädelbasis am Grund der *Sella turcica* in der sogenannten *Fossa hypophysialis*. Am Rande dieser Grube (*Dorsum sellae*) bildet die *Dura mater encephali* das *Diaphragma sellae*, welches die Hypophyse tierartsspezifisch unterschiedlich weit überzieht und beim Schwein fehlt. Die dorsale Verbindung der Hypophyse zum Zwischenhirn über den Hypophysenstiel liegt zwischen der Sehnervenkreuzung (*Chiasma opticum*) und dem *Corpus mammillare* des Zwischenhirns [53].

Die Adenohypophyse befindet sich beim Menschen und beim Schwein rostral der Neurohypophyse. Die stark vaskularisierte *Eminentia mediana* des Hypothalamus am Übergang zum *Infundibulum* ist der Ausgangspunkt für das Portalvenensystem der Adenohypophyse [53]. Die arterielle Blutzufuhr erfolgt über die *Arteria carotis interna*, die im Bereich der Hypophyse Kontakt zu weiteren Arterien (wie zum Beispiel den *Arteriae maxillares*) aufnimmt und an dieser Stelle das arterielle Wundernetz (*Rete mirabile epidurale rostrale*) bildet. Die ebenfalls aus der *Arteria carotis interna* hervorgehenden *Arteriae hypophyseales rostrales* gehen in einem primären Kapillargebiet in Venen über, die weiter entlang der *Pars infundibularis* der Neurohypophyse zur *Pars distalis* der Adenohypophyse ziehen, um dort in ein sekundäres Kapillargebiet einzutreten [53,73]. Dieses System ermöglicht eine hohe Konzentration von, durch den Hypothalamus ausgeschütteten, Steuerungshormonen am zentralen Wirkungsort, der Adenohypophyse [53,74] (Abbildung 2).

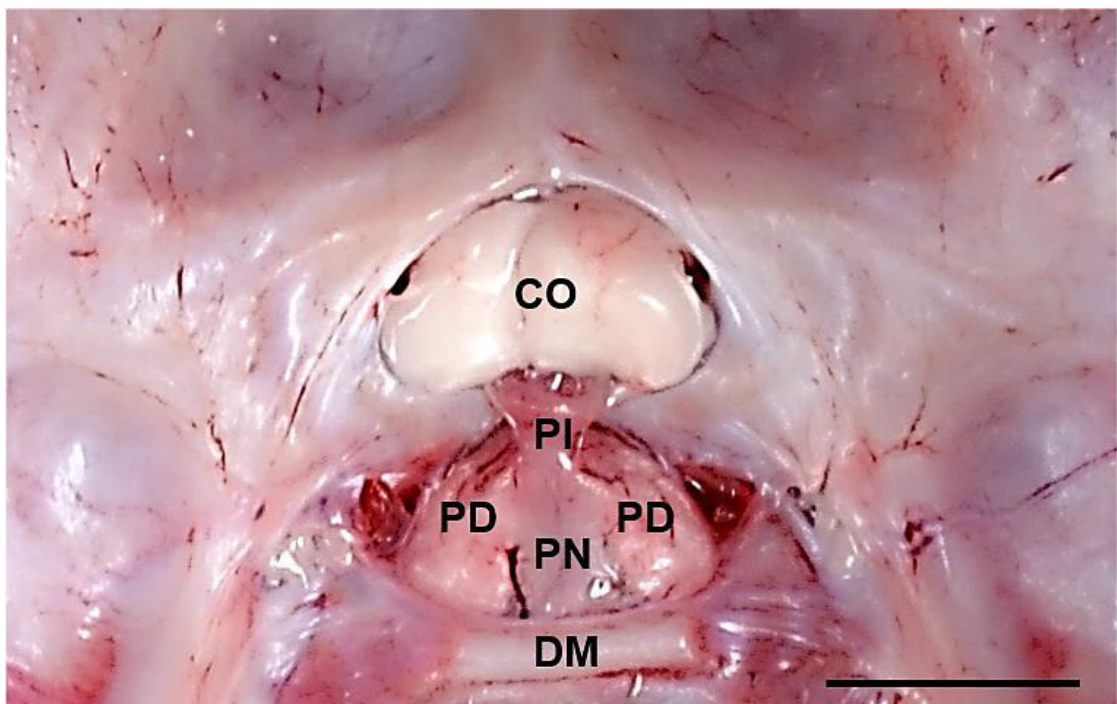


Abbildung 2: Hypophyse eines Schweines *in situ*. Dorsale Ansicht der Schädelbasis nach Entfernung des Schädeldachs und des Gehirns. Die Hypophyse liegt kaudal der Sehnervenkreuzung (*Chiasma opticum*, CO) außerhalb der *Dura mater*, DM. Die makroskopisch abgrenzbaren Anteile der Hypophyse, die *Pars nervosa*, PN, die *Pars distalis*, PD und die *Pars infundibularis*, PI sind gekennzeichnet. Balken: 1 cm. Abbildung: Isabel Hofmann, 2020.

Histologisch lassen sich in der Hämatoxylin und Eosin-Färbung (HE-Färbung) drei Teile der Hypophyse abgrenzen. Die *Pars distalis* (Adenohypophyse), die *Pars intermedia* und die *Pars nervosa* (Neurohypophyse) (Abbildung 3).

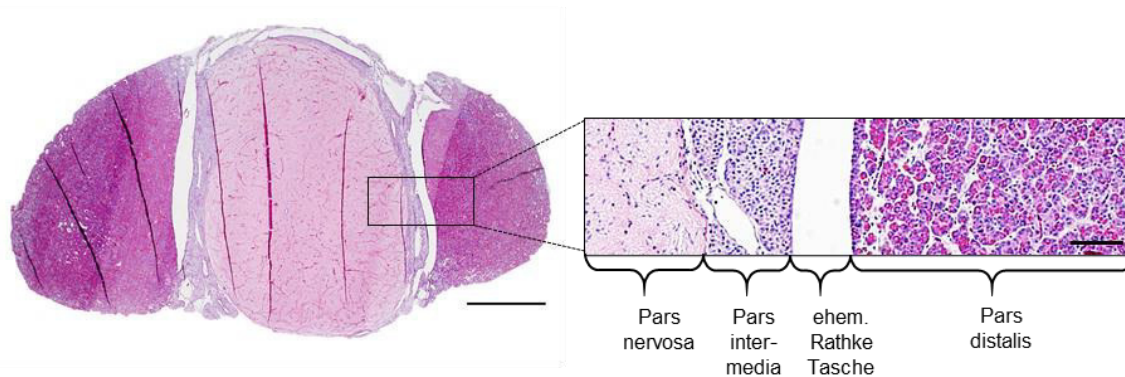


Abbildung 3: Histologie der Hypophyse. Transversaler Schnitt durch die Hypophyse eines Schweins, HE-Färbung (Paraffinschnitt). Die *Pars intermedia* bildet ein schmales Band zwischen der *Pars nervosa* und der *Pars distalis*. Balken links: 1mm, rechts: 500µm. Abbildung: Isabel Hofmann, 2020.

Bei höherer mikroskopischer Vergrößerung kann man in der Adenohypophyse, anhand ihres Färbeverhaltens in der HE-Färbung, drei unterschiedliche Zellpopulationen unterscheiden (azidophile, basophile und chromophobe Zellen), die aus sechs verschiedenen endokrinen Zellarten bestehen, welche nach den jeweiligen Hormonen benannt sind, die sie produzieren und ausschütten. Zu den azidophilen Zellen, deren zytoplasmatische Granula sich mit sauren (azidophilen) Farbstoffen anfärben lassen, zählen die somatotropen Zellen und die laktotropen Zellen. In ihnen wird GH, respektive Prolaktin (PRL) synthetisiert und gespeichert [74]. In einigen Spezies wird auch von der Existenz mammosomatotroper Zellen berichtet, die sowohl zur Synthese von GH als auch von PRL fähig sind [70,75–77]. Basophile Zellen, enthalten zytoplasmatische Granula, die sich mit basischen (basophilen) Farbstoffen anfärben lassen. Basophile Zellen umfassen thyreotropen Zellen, die Thyreotropin (Thyroidea-stimulierendes Hormon, TSH) produzieren, welches die Schilddrüsenaktivität anregt, zwei Populationen gonadotroper Zellen, die Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) beziehungsweise luteinisierendes Hormon (LH), produzieren und die Gonadenfunktion regulieren, sowie kortikotrope Zellen, die Adrenokortikotropes Hormon (ACTH) produzieren, welches insbesondere auf die Nebennierenrinde wirkt [70].

Das in den kortikotropen Zellen der Adenohypophyse und in den endokrinen Zellen der *Pars intermedia* produzierte Proopiomelanocortin (POMC) ist ein Vorläuferprotein aus dessen Spaltung verschiedene endokrin wirksame Proteohormone gebildet werden können, darunter fallen unter anderem ACTH und Melanotropin (Melanozyten-stimulierendes Hormon, α -MSH), das die Bildung von Melanin reguliert [70,78,79]. Darüber hinaus entstehen bei der Spaltung von POMC endogene Opiode (wie zum Beispiel β -Endorphin), die vielfältige Funktionen im Organismus ausüben [80]. Chromophobe Zellen weisen weder ein azidophiles noch ein basophiles zytoplasmatisches Färbemuster auf. Sie bestehen aus einer heterogenen Gruppe von Zellen, darunter mesenchymale Zellen, degranulierte endokrine Zellen und follikulostellare Zellen. Letzteren werden unter anderem regulative Funktionen und eine potenzielle Stammzellfunktion für endokrine Zellen der Adenohypophyse zugeschrieben [81]. Zur genauen Differenzierung dieser verschiedenen Zellarten werden spezifische immunhistochemische Methoden angewandt, die mit Hilfe von gegen das Zielhormon gerichteten spezifischen Antikörpern die Detektion der jeweilige Zellpopulation ermöglichen [70] (Abbildung 4).

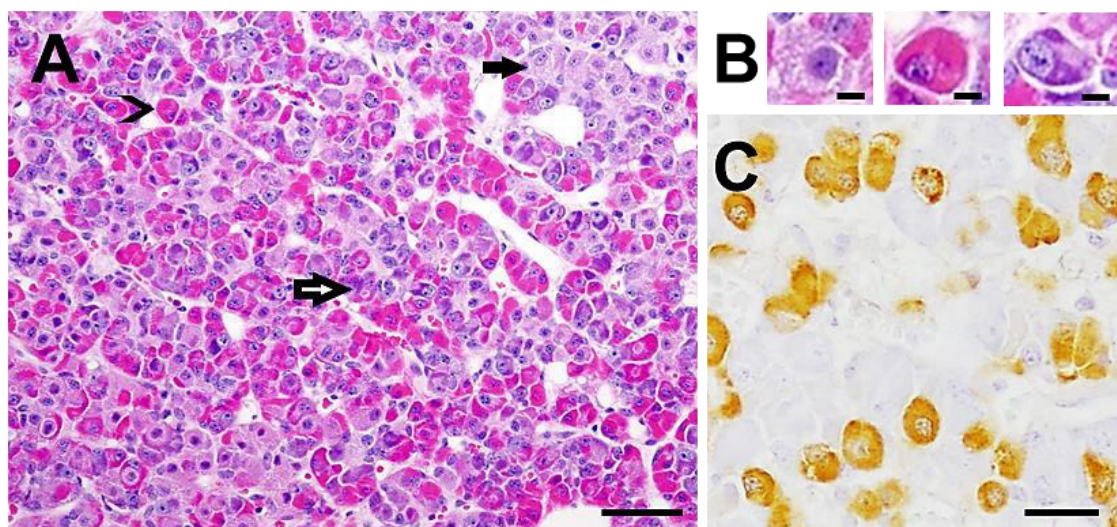


Abbildung 4: Zellen der Adenohypophyse. Paraffinschnitte, Schwein, HE-Färbung und immunhistochemische Darstellung GH-positiver Zellen. **A:** Drei verschiedene Zellarten (azidophile (rot), basophile (blau) und chromophobe Zellen (blass) sind mit unterschiedlichen Pfeilen markiert und in **B** in Detailvergrößerung gezeigt. **C:** Mit der Hilfe eines gegen GH gerichteten Antikörpers lassen sich in einer immunhistochemischen Darstellung die somatotropen Zellen (braun), von den in der HE-Färbung ebenfalls azidophil erscheinenden lactotropen Zellen, abgrenzen. IHC: 1. Antikörper: goat@ratGH, 2. Antikörper: rabbit@goat horseradish peroxidase (HRP) gekoppelt. Chromogen: Diaminobenzidin (DAB). Kernfärbung: Hämalaun. Balken: 20 μ m in **A** und **C**, 5 μ m in **B**. Abbildung: Isabel Hofmann, 2020.

Beim Menschen, stellen die somatotropen Zellen mit bis zu 50 % den größten Anteil an den endokrinen Zellen der Adenohypophyse dar [70,82]. Beim Schwein sind somatotrope Zellen rund bis oval und messen 10-20 µm im Durchmesser, sie besitzen einen gleichmäßig runden Zellkern und weisen ein ungleichmäßiges Verteilungsmuster innerhalb der Adenohypophyse auf [76,83,84]. Auf ultrastruktureller Ebene weist das Zytoplasma der somatotropen Zellen einen hohen Gehalt an rauem endoplasmatischem Retikulum, Golgiapparat sowie zahlreiche 300-500 nm große, kugelige, sekretorische Granula, die GH enthalten auf. Der Zellkern besitzt einen deutlichen Nucleolus [84].

In Studien von Bonnefont *et al.* aus dem Jahr 2005 [85] und Lafont *et al.* aus dem Jahr 2009 [86] wurde der Zusammenschluss der somatotropen Zellen zu einem dreidimensionalen Netzwerk und seine funktionelle Bedeutung gezeigt. Die Zellansammlungen somatotroper Zellen stehen durch Stränge aus einzelnen somatotropen Zellen mittels Adhäsionsverbindungen in Kontakt. Dieses hochorganisierte, plastische Netzwerk aus somatotropen Zellen scheint im Zusammenspiel mit der Regulation der adenohypophysären Mikrozirkulation an der koordinierten Generierung von GH-Pulsen, in Folge einer Stimulation durch GHRH, beteiligt zu sein. [85,86].

Detaillierte Erkenntnisse über das Verteilungsmuster und die altersabhängige Verteilung der somatotropen Zellen innerhalb der porcinen Adenohypophyse konnten 2004 in einer Veröffentlichung von Lee *et al.* [76] dargestellt werden. Grundsätzlich erwies sich die Verteilung der somatotropen Zellen über alle untersuchten Altersgruppen (bis zu einem Alter von 100 Tagen) hinweg als bilateral symmetrisch, gleichzeitig zeigte sich eine höhere Dichte von somatotropen Zellen in den lateralen Bereichen und am Übergang zur *Pars intermedia* der Adenohypophyse [76].

2.1.3 Wachstumshormon

Das Wachstumshormon, engl. *growth hormone* (GH) oder auch Somatotropin, gehört zur Gruppe der Proteohormone. Beim Menschen handelt es sich überwiegend um ein einkettiges Polypeptid, aus 191 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 22 kDa [58,87]. Das Molekül besteht aus vier antiparallelen α -Helices mit intramolekularen Disulfidbindungen, die ihm seine Tertiärstruktur verleihen. Strukturell weist es außerdem eine Ähnlichkeit zum, in der menschlichen Plazenta gebildeten, Plazenta-Laktogen auf [88]. GH ist hochkonserviert und unterscheidet sich beim Schwein nur in wenigen Aminosäuren vom menschlichen Protein [89]. Die Synthese, Speicherung und Sekretion von GH erfolgt in somatotropen Zellen der Adenohypophyse [58].

GH liegt im Zytoplasma der somatotropen Zellen in sekretorischen Vesikeln vor, die Ausschüttung (Exozytose) von GH erfolgt nach der Stimulation der Zelle durch transiente Fusion der Vesikel mit der Zellmembran an sogenannten Porosomen [90]. Eine wesentliche Rolle bei der Katalyse der Fusionsprozesse spielen die Proteine des sogenannten *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*-Komplexes (SNARE-Komplex) [91]. Über eine mögliche Beteiligung des Membranproteins Dystrophin am Exozytoseprozess von GH aus den Granula der somatotropen Zellen der Adenohypophyse wird ebenfalls diskutiert [30], hierzu liegen bislang keine umfassenden Studien vor.

Die Effekte von GH umfassen neben der Förderung von Wachstumsprozessen auch wesentliche weitere Stoffwechselfunktionen [45,47]. Neben zahlreichen durch IGF1 vermittelten indirekten Effekten von GH existieren einige direkte, IGF1-unabhängige GH-Effekte. GH stimuliert neben der IGF1 Produktion in der Leber, die die wichtigste Quelle von systemischen IGF1 darstellt, auch die Produktion von IGF1 in einer Reihe von weiteren Organen, in denen eine auto-beziehungsweise parakrine Wirkung von IGF1 vorherrschend ist [34,36,37,40,41]. Dies macht eine Differenzierung von IGF1-abhängigen und IGF1-unabhängigen Effekten, die direkt durch GH an den Organen und im Stoffwechsel vermittelt werden, schwierig.

Zur Erforschung der Rolle einzelner Komponenten des GH/IGF1-Systems und ihrer voneinander abhängigen und unabhängigen Effekte auf verschiedene Organe und pathologische Prozesse, wurde eine Reihe an genetisch modifizierten Mausmodellen, bei denen einzelne Faktoren des GH/IGF1-Systems ubiquitär oder zelltypspezifisch überexprimiert oder ausgeknockt wurden, untersucht [52,92–94]. Es gibt Hinweise darauf, dass GH auch einen direkten Effekt auf das Längenwachstum der langen Röhrenknochen ausübt, indem es die epiphysealen Chondrozyten stimuliert und die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten überwiegend durch lokale auto- und parakrine IGF1 Produktion fördert [35,95]. In der Niere konnte eine GH-abhängige Induktion einer glomerulären Hypertrophie und Glomerulosklerose nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte ein GH-abhängiger Einfluss von IGF1 auf das hyperplastische Wachstum von proximalen Tubuluszellen nachgewiesen werden [37,51].

Ein wichtiger metabolischer Effekt von GH ist die Lipolyse und die damit verbundene Freisetzung von freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe, welche wiederum durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus auf hypothalamischer und hypophysärer Ebene die GH-Sekretion regulieren [36,45]. In Folge von langanhaltender GH-Ausschüttung kommt es zu einem erhöhten Blutzuckerspiegel. In Kombination mit einer erhöhten Insulinausschüttung, bei gleichzeitig herabgesetzter Insulinsensitivität kann der diabetogene Langzeiteffekt von GH erklärt werden [34,35,44,47]. GH steigert die Retention von Kalium, Natrium und Phosphor im Tubulussystem der Niere und erhöht die Bikarbonat-Konzentration im Serum und nimmt somit Einfluss auf den Säure-Base Haushalt [35,96]. Eine wichtige Rolle besitzt GH auch in der Regulation von wichtigen Funktionen des Immunsystems. Einige Immunzelltypen, wie beispielsweise B-Zellen besitzen einen GHR und sind zur Produktion von GH-Isoformen auf Proteinebene fähig, welche zu einer Modulation des Immunsystems über endo-, para-, auto- und intrakrine Signalwege beitragen [35,49,97,98].

Die Bindung von GH an seinen Rezeptor (GHR) auf der Zelloberfläche unterschiedlicher Zielzellen löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus.

Der GHR ist Teil der Zytokinrezeptorfamilie und besteht aus einer extrazellulären Bindungsdomäne, einer helikalen transmembranen Region und einer intrazellulären Domäne, die die intrazelluläre Übertragung des Signals, das durch die Bindung von GH ausgelöst wird, vermittelt [34,47]. Durch die Bindung an zwei unterschiedlichen GH-Bindungsstellen am zweiteiligen Rezeptor (Homo-Dimer) kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptor-Proteinkomplexes und zur Signaltransduktion. Die Konformationsänderung (Rotation) führt intrazellulär zur Aktivierung der Kinasedomäne der an beide GHR-Monomere gebundenen Januskinase 2 (JAK2). JAK2 ist in der Lage verschiedene Proteine aus der *signal transducers and activators of transcription* (STAT)-Familie zu phosphorylieren, die nach Eintritt in den Zellkern die Transkription von Zielgenen wie *IGF1* und *IGFBP3* regulieren. Weitere Signaltransduktionskaskaden des GHR beinhalten den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg und den *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) Signalweg in Verbindung mit dem *insulin receptor substrate* (IRS) und der *phosphoinositide-3-Kinase* (PI3K) [47,49,99,100].

Ein großer Teil des ausgeschütteten GH (bis zu 50 %) ist im Blut an GH-Bindungsprotein (GHBP) gebunden, welches die Halbwertszeit von GH erhöht und die Aktivität von freiem GH herabsetzt [47,55,101]. Das N-terminale Ende dieses löslichen Bindungsproteins ist identisch mit der extrazellulären Domäne des GHR [58]. Beim Menschen wird das GHBP mittels Proteolyse vom GHR abgespalten, während bei Nagern alternatives Spleißen der RNA des *Ghr* Transkripts für die ribosomale Translation des Ghbp Proteins verantwortlich ist [34]. GHBP Plasmakonzentrationen spiegeln beim Menschen das Vorkommen des GHR in der Leber wider [47].

Veränderungen der GH-Sekretionsmenge haben Auswirkungen auf den gesamten Organismus und können in den typischen Krankheitsbildern eines Wachstumshormonmangels, GH-Defizienz (GHD) [55] oder einer Wachstumshormonhypersekretion in Form von Gigantismus [102] beziehungsweise Akromegalie [103] resultieren. Dem absoluten Mangel an GH können unterschiedliche angeborene und erworbene Ursachen zu Grunde liegen [47]. Neben der idiopathischen GHD sind auch häufig Mutationen im Gen des GHRH-Rezeptors (*GHRHR*) oder im *GH1* Gen beteiligt [104,105].

Während der Wachstumsphase verursacht ein Mangel an GH Kleinwüchsigkeit, beim Menschen definiert durch ein Körperlängenwachstum, das unter dem 3. Perzentil entsprechend gleichaltriger Kinder liegt, oder mehr als die doppelte Standardabweichung vom Mittelwert beträgt [47,106]. Die Diagnose kann dabei aufgrund der pulsatilen Ausschüttung und der komplexen Regulation von GH nicht auf der Basis einfacher Messungen der Konzentration von GH im Serum, zu einem zufällig gewählten Zeitpunkt, erfolgen [47]. In der klinischen Diagnostik werden daher einerseits Stimulationstests (beispielsweise mit Arginin und Levodopa (L-Dopa)) und andererseits Serienmessungen von Serum-GH-Konzentrationen im Tagesverlauf herangezogen [47]. Beim Menschen korreliert die Menge der IGF1-Konzentration im Serum eng mit der GH-Ausschüttung [47]. Das Volumen der Hypophyse kann mit bildgebenden Verfahren (wie beispielsweise der Magnetresonanztomographie, MRT) bestimmt und ebenfalls als diagnostischer Parameter für die GHD herangezogen werden [107,108].

Eine GH-Insensitivität (GHI) wirkt sich klinisch ähnlich wie eine GHD aus. Die GHI kann ebenfalls angeboren oder erworben sein. Mutationen im *GHR* Gen verursachen, im gut charakterisierten, sehr selten auftretenden, Krankheitsbild des Laron-Syndroms eine Inaktivität des GHR [109–111]. Die GH-Konzentrationen im Serum sind bei diesen Patienten zwar erhöht, allerdings unterbleibt durch die gestörte Reaktion von GH an seinem Rezeptor die nachfolgende IGF1-Produktion und somit auch die negative Rückkopplungsreaktion von GH und IGF1 auf die Ausschüttung von GH [55,62,112]. In Folge dessen leiden Laron-Patienten neben Kleinwüchsigkeit an Adipositas, Hypoglykämie und verzögertem Eintritt in die Pubertät, während in einigen Fällen interessanterweise, eine geringere Inzidenz für Typ 2 Diabetes vorliegt [113]. Zur Behandlung der Folgen des Laron-Syndroms wird IGF1 eingesetzt [109].

Auch Entzündungsreaktionen beeinflussen beim Menschen die Abundanz des GHR auf unterschiedliche Weise [49]. Entzündungsmediatoren sind beispielsweise in der Lage, negative Effekte auf die GHR-Expression der Zellen auszuüben und können dadurch die Sensitivität für GH herabsetzen [49].

Eine Hypersekretion von GH wird hauptsächlich durch adenohipophysäre Adenome hervorgerufen. Der Überschuss an GH und nachfolgend lokal produziertem IGF1 führt vor dem Schluss der Epiphysenfugen, bei im Wachstum befindlichen Patienten, zu Riesenwuchs (Gigantismus) [102]. Im Erwachsenenalter kommt es zum Krankheitsbild der Akromegalie, das zu einer Insulinresistenz sowie zu einer herabgesetzten Lebenserwartung führt [103]. Um die GH-Sekretion endokrin aktiver Hypophysenadenome zu reduzieren, gibt es verschiedene chirurgische, radiotherapeutische und pharmakologische Behandlungsansätze [114].

2.1.4 Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1

Der Insulinähnliche Wachstumsfaktor 1, *Insulin-like growth factor 1* (IGF1) ist von zentraler Bedeutung für die Vermittlung zahlreicher GH-induzierter Wachstumsprozesse [36,67]. Ursprünglich wurden die Insulinähnlichen Wachstumsfaktoren 1 und 2 daher als Somatomedine bezeichnet, später wurden sie aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Proinsulin neu benannt [34,115]. Im Gegensatz zu GH sind IGF1 und 2 essenziell für die embryonale Entwicklung und das intrauterine Wachstum [34]. In IGF1-Rezeptor-KO (IGF1R-KO)-Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die IGF1R-KO-Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren drastisch reduzierte Geburtsgewichte und hohe Sterblichkeitsraten aufwiesen [35,37,67,116,117]. Postnatal erlangt das Zusammenspiel aus GH und IGF1 eine entscheidende Bedeutung bei der Vermittlung von Wachstumsprozessen. Für die proliferativen und metabolischen Effekte von IGF1 scheinen die autokrinen und parakrinen, Wirkungen von IGF1 in fast allen Organen von entscheidenderer Bedeutung zu sein, als die des zum Großteil in der Leber produzierten und in die Zirkulation abgegebenen, endokrin wirksamen IGF1 [34–37,40,41].

Humanes IGF1 ist ein Polypeptid, das aus 70 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 7649 Da aufweist. In seiner Struktur ist eine Ähnlichkeit mit der A- und B-Kette des Proinsulins erkennbar [115,118]. Aufgrund der strukturellen Homologie zum Insulin ist IGF1 in der Lage, neben der Bindung an den IGF1R zusätzlich mit geringerer Affinität auch an den Insulin Rezeptor (IR) zu binden [119].

Der IGF1R, der in seiner Struktur dem IR ähnelt, besteht aus zwei extrazellulär gelegenen α -Untereinheiten, die über Disulfidbindungen mit zwei transmembranen β -Untereinheiten verbunden sind. Die β -Untereinheiten verfügen über eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität, die den Ausgangspunkt für den Signaltransduktionsmechanismus darstellt [67]. Nach der Bindung von IGF1 am IGF1R kommt es zur Autophosphorylierung. Der so aktivierte Rezeptor ist dann in der Lage weitere Substrate, wie z.B. das Insulin Rezeptor Substrat 1 (IRS1), zu phosphorylieren und im Verlauf eine Phosphorylierungs-Kaskade, unter Beteiligung von Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K) und weiteren Enzymen, auszulösen.

Der IGF1R kann auch IGF2 mit einer geringen Affinität binden, außerdem kommen Hybriden aus IGF1R und IR vor, die eine höhere Affinität für IGF1 aufweisen als der IR. Der IGF1R wird physiologischerweise von nahezu allen Zellen verschiedener Organe, mit Ausnahme der Hepatozyten, exprimiert [46,55,62,119].

Im Serum sind 99 % des IGF1 an Bindungsproteine (IGFBPs) gebunden, welche die Verfügbarkeit von freiem IGF1 beeinflussen, dessen Halbwertszeit verlängern und daneben auch eigene, IGF1-unabhängige, regulatorische Effekte auf den Metabolismus ausüben [62,120–123]. Im Serum und im Interstitium kommen sechs verschiedene IGFBP vor, die mit einer hohen Affinität an IGF1 binden, sowie mindestens drei mit den IGFBP verwandten Proteine (*IGFBP related proteins*, IGFBPrP), welche eine geringere Affinität zu IGF1 aufweisen. Das am häufigsten vorkommende Bindungsprotein im Serum ist das IGFBP3, seine Expression in der Leber ist eng an die ausgeschüttete GH-Menge gekoppelt. Beim Menschen bildet IGFBP3 einen ca. 150kDa großen, funktionellen Komplex mit IGF1 und einem weiteren, GH-abhängigen Protein, der Säure labilen Untereinheit, *Acid-labile subunit* (ALS). Die IGFBP3 und ALS Expression in der Leber erfolgt direkt als Reaktion auf die GH-Bindung [121,124]. IGFBP können die IGF1 abhängigen Wachstumseffekte über die Bindung von freiem IGF1 reduzieren (wie bei IGFBP1 [46], IGFBP2 [120,125] und IGFBP4 [126]), aber auch erhöhen zum Beispiel über eine Bereitstellung von IGF1 am Rezeptor von Zielzellen (wie bei IGFBP3 [123] und IGFBP5 [46,127]). IGFBP6 weist eine höhere Affinität für IGF2 auf [124,128]. IGFBP vermitteln auch zahlreiche, komplexe und speziesspezifisch unterschiedliche IGF1-unabhängige Effekte, die unter anderem auch vom nutritiven Status abhängen [45,122,129]. Einzelne IGFBP weisen eine Beteiligung am Energie- und Knochenstoffwechsel sowie an der Regulation von diversen pathogenetisch relevanten Prozessen, u.a. in der Tumorentstehung, auf [35,46,121].

Die GH-Ausschüttung wird mit Hilfe einer negativen Rückkopplungsschleife reguliert, dabei hemmt IGF1, welches nach GH-Stimulation gebildet wird, die Sekretion von GH in der Adenohypophyse [44]. IGF1 inhibiert zusätzlich die hypophysäre GH-Sekretion, indem es die Ausschüttung von SIH stimuliert und die GHRH Sekretion im Hypothalamus inhibiert [44,58].

IGF1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Muskelmasse und bei Muskelreparationsprozessen [130]. Der nach Aktivierung des IGF1R und des IR nachgeschaltete Signalweg aus PI3K und der Serin/Threonin-Kinase (AKT) PI3K/AKT, kann durch Training im Muskel aktiviert werden und führt zu einer Erhöhung der Proteinsynthese, bei gleichzeitiger Hemmung des Proteinabbaus [65]. Dies führt zu einem anabolen Effekt von GH beziehungsweise von IGF1 am Muskel, wobei dem im Muskel produzierten para- und autokrin wirksamen IGF1, funktionell eine wichtige Bedeutung zukommt [131]. In der Folge von intensivem Training, kommt es in der Muskulatur beispielsweise zu einer lokalen Produktion von IGF1, unabhängig vom GH-Status [65,66]. IGF1 stimuliert die Fusion von Satellitenzellen mit bestehenden Muskelfasern [132]. GHD-Patienten weisen in der Regel eine Reduktion der Muskelmasse und eine Erhöhung des Körperfettanteils auf [45]. Bei Patienten mit Akromegalie (mit dauerhaft erhöhten Serumkonzentrationen von GH und IGF1), geht eine Erhöhung des Muskelanteils mit einer geringeren spezifischen Muskelkraft und kleineren Muskelfaserdurchmessern der Typ II Muskelfasern, einher [133]. Zum therapeutischen Einsatz von IGF1 kommt es bei der Behandlung der GHI (beispielsweise beim Laron-Syndrom) [109].

Darüber hinaus sind diverse Krankheitszustände wie Mangelernährung, Sepsis, chronische Entzündungen mit einem Mangel an IGF1 in der Muskulatur verbunden [134]. Verschiedene Studien untersuchten daher die Einsatzmöglichkeiten einer IGF1 Administration bei unterschiedlichen Krankheitsbildern, die mit Muskelschwächezuständen assoziiert sind [130]. In Studien zu verschiedenen neuromuskulären Erkrankungen wie der spinalen Muskelatrophie (SMA), der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) und der Duchenne-Muskeldystrophie (DMD), wurden im Tiermodell die Effekte von systemischer und lokaler IGF1 Gabe untersucht. Die IGF1-Administration konnte in einigen dieser Studien dem Muskelabbau vorbeugen und teilweise sogar reversible Effekte erzielen [135,136]. Zur Erhöhung der Stabilität und Verlängerung der Halbwertszeit bei der systemischen Gabe, kann IGF1 an Polyethylenglykol (PEG) gekoppelt werden [137]. Um effektive Konzentrationen am Wirkungsort zu erreichen und auto- beziehungsweise parakrine Effekte zu nutzen, wird daran geforscht IGF1 bei verschiedenen Muskelerkrankungen mittels abbaubarer Mikrosphären lokal zu verabreichen [130].

Akute Nebenwirkungen der IGF1-Therapie sind Hypoglykämie und GH-Suppression. Ein potenziell gesteigertes Risiko für Neoplasien in Folge von langfristiger, systemischer IGF1 Gabe kann außerdem nicht vollständig ausgeschlossen werden [130].

2.2 Duchenne-Muskeldystrophie (DMD)

Die Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) ist eine X-chromosomal-rezessive Erbkrankheit, die durch fortschreitende Muskelschwäche charakterisiert ist. Die erstmalig 1851 von Edward Meryon (1809-1880) beschriebene Erkrankung, ist seit 1868 nach Guillaume Duchenne (1806-1875) benannt [1,138,139]. Betroffene weisen einen Mangel an funktionstüchtigem Muskelfasermembranprotein „Dystrophin“ auf, der durch Mutationen im für Dystrophin codierenden *DMD* Gen hervorgerufen wird [1]. Circa einer von 3500 männlichen Neugeborenen ist von dieser bislang unheilbaren Erkrankung betroffen, die mit einer stark reduzierten Lebenserwartung einhergeht. Mädchen sind dagegen aufgrund des X-chromosomalen Erbgangs deutlich seltener betroffen [3]. Es besteht eine enge Verwandtschaft zwischen der DMD [140] und der Becker-Muskeldystrophie (BMD) [141] (siehe Abschnitt 2.2.1). Die schwerwiegende Symptomatik der DMD-Erkrankung umfasst den Verlust der Geh- und Stehfähigkeit und ist im progressiven Verlauf durch Atem- beziehungsweise Herzversagen gekennzeichnet [4]. Des Weiteren ist DMD in einigen Fällen mit Adipositas, Insulinresistenz, Kleinwüchsigkeit und geistiger Retardierung assoziiert [14,24,142]. Der Einsatz von Kortikosteroiden, der den progressiven Verlauf der Erkrankung zum Teil abschwächt, verstärkt einige dieser Symptome durch die Nebenwirkungen der Kortikosteroidtherapie [10,16]. Zur Erforschung diverser Aspekte der Pathogenese der DMD und zur Erprobung, neuer therapeutischer Strategien (siehe Abschnitt 2.2.1), werden verschiedene Tiermodelle der Erkrankung eingesetzt, die teils durch eine spontane Mutation (Golden Retriever), teils durch gezielte genetische Modifikation (Mäuse, Ratten, Schweine und Kaninchen) entstanden sind [26,27,29] (siehe Abschnitt 2.2.5).

2.2.1 Pathogenese, Krankheitsverlauf und Therapie der DMD

Die Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) ist eine der häufigsten vorkommenden, monogenen Erbkrankheiten. Ursächlich liegen der DMD eine oder mehrere Mutationen im *DMD* Gen zu Grunde. Das *DMD* Gen besteht beim Menschen aus ca. 2,4 Millionen Basenpaaren und umfasst 79 Exons. Es stellt somit das größte bekannte Gen im menschlichen Genom dar [143,144]. Zu den am häufigsten vorkommenden Mutationstypen, die das Krankheitsbild der DMD auslösen, gehören Deletionen im *DMD* Gen. Der folgende Verlust von einem oder mehreren Exons führt häufig zu einer Verschiebung des Leserasters (*out of frame mutation*), wodurch die Synthese eines funktionellen Dystrophin Proteins verhindert wird [140,145]. Daneben kommen auch Deletionen vor, bei denen das Leseraster erhalten bleibt und ein verkürztes, semifunktionsfähiges Dystrophin entsteht, wie es bei der milderen Becker-Muskeldystrophie (BMD) der Fall ist [141]. Außerdem existieren beispielsweise Punktmutationen, bei denen nur ein Basenpaar betroffen ist. Man spricht von einer *nonsense* Mutation, wenn dadurch die DNA-Sequenz so verändert wird, dass ein Stopcodon an der Mutationsstelle entsteht und es zum Abbruch auf der Transkriptionsebene kommt und in der nachfolgenden Translation ein verkürztes Protein entsteht [145]. Zusätzlich kommen Duplikationen und verschiedene Spleißmutationen vor [145]. Im gesunden Menschen kommen bis zu 7 verschiedene unterschiedlich lange Isoformen des Proteins Dystrophin vor, die jeweils von unterschiedlichen Promotoren im *DMD* Gen exprimiert werden und nach ihrer Größe benannt sind (Dp427m, Dp427c, Dp427p, Dp260, Dp140, Dp116 und Dp71) [4,6]. Es existiert zusätzlich eine noch kürzere Isoform Dp40, die ein gemeinsames erstes Exon mit Dp71 besitzt [146]. Dystrophinisoformen werden in unterschiedlichen Gewebearten exprimiert, wobei das lange Dp427 besonders in Skelettmuskelzellen, Purkinje-Zellen des Herzens und in den Nervenzellen des Hippocampus vorkommt [6]. Dp40 kommt auch im Hippocampus vor und spielt möglicherweise eine Rolle bei der synaptischen Transmission und bei der Gehirnfunktion [146,147] (siehe Abschnitt 4.4). Andere Isoformen kommen ebenfalls in der Muskulatur vor, außerdem in vielen anderen Geweben wie in der Retina, in der Niere und in peripheren Nerven [4,148–150].

Obwohl die oben genannten Mutationen in jedem Bereich des *DMD* Gens vorkommen können, gibt es beim Menschen einen kleineren Mutationsschwerpunkt (*hot spot*) im Bereich zwischen Exon 2 und Exon 20 sowie einen größeren Mutationsschwerpunkt zwischen Exon 45 und Exon 53 [151,152].

Dystrophin bildet ein Grundelement des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes (DGC), der wesentlich zum Erhalt der Stabilität des Sarkolemms, insbesondere während der Muskelkontraktionszyklen, beiträgt. Im gesunden Skelettmuskel agiert dieses Muskelfasermembranprotein, als mechanische Verbindungsstelle komplex bei der Vernetzung zwischen dem Zytoskelett, der Zellmembran (Sarkolemm) und der extrazellulären Matrix [153]. Hierfür verfügt Dystrophin über eine enge Bindung an das intrazelluläre Aktinfilament und an Proteine wie Dystroglykane, die mit Sarkoglykanen und dem Sarkospan innerhalb des transmembranen Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes verbunden sind, der wiederum selbst an das extrazelluläre Laminin, einem Bestandteil der Basalmembran der Muskelfasern, gekoppelt ist [154,155]. Das stabförmige Dystrophinmolekül ist aus vier Hauptdomänen zusammengesetzt, einer N-terminalen Domäne, einer zentralen, langen Domäne, einer cysteinreichen Domäne und der C-terminalen Domäne (Abbildung 5). Vier prolinreiche Zonen (H1-H4) unterteilen die zentrale Domäne des Dystrophinmoleküls und verleihen ihm, ähnlich wie Scharniere, eine besondere Flexibilität, die bei seiner protektiven und stabilisierenden Wirkung, auf die Muskelfasermembran während der Kontraktionszyklen und Faserdehnungen, eine Rolle spielt [10,156] (Abbildung 5).

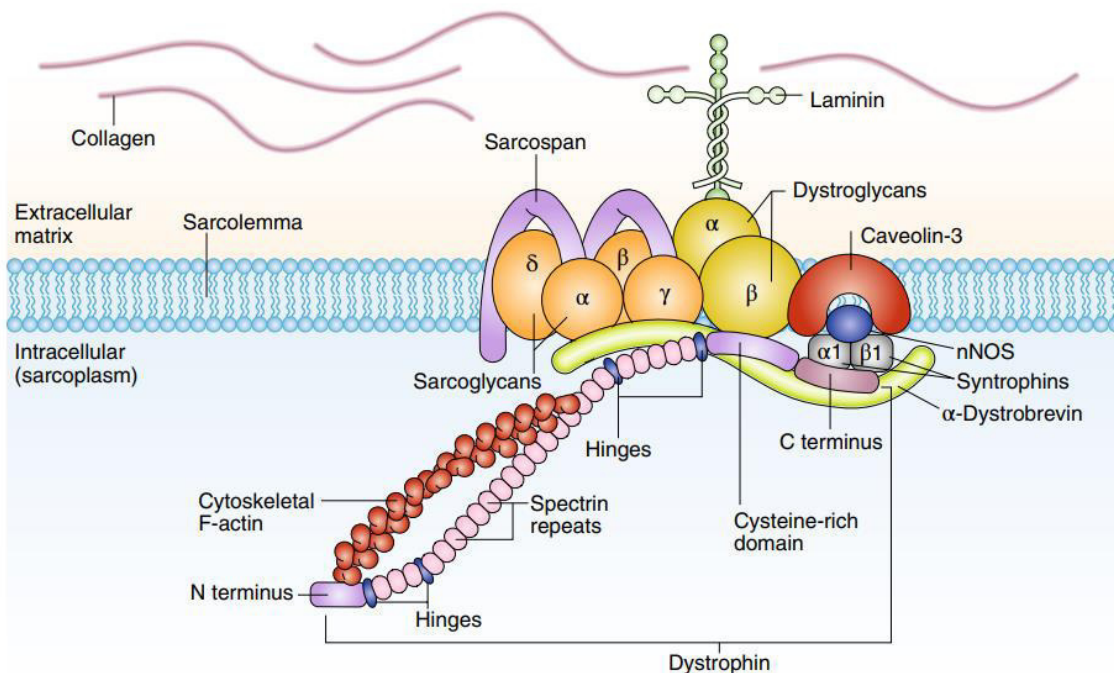


Abbildung 5: Schematische Abbildung des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes (DGC) in der Muskelfasermembran. Dystrophin ist ein längliches Protein, das eine Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix der Muskelfaser herstellt. Es verbindet dabei F-Aktin mit Proteinen des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes (DGC). Neben Dystrophin tragen auch andere Proteine des DGC, die gleichzeitig Bestandteile des Sarkolemmms sind, zur Stabilität der Muskelfaser bei (siehe Abschnitt 2.2.1). Abbildung aus Jones, 2019 [157].

Der Verlust von funktionstüchtigem Dystrophin bei DMD-Patienten führt folglich, zu einer Störung der Funktion des DGC und damit zu einer Destabilisierung der Muskelfasermembran. Es kommt zu mikroskopisch kleinen Läsionen in der Plasmamembran, durch die ein Verlust von intrazellulären Komponenten aus der Muskelzelle, wie beispielsweise Kreatinkinase (CK) erfolgt [153]. Darüber hinaus ist die Kalziumkonzentration intrazellulär im Muskel erhöht und trägt so zu einer erhöhten Aktivität von intrazellulären Proteasen und einer weiteren Schädigung der Muskelzellen bei [144]. Die intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung ist einerseits eine Konsequenz des Kalziumeinstroms aus dem Extrazellulärraum in Folge des Membranschadens, andererseits trägt eine erhöhte Sensitivität der Kalziumkanäle in Folge von mechanischen Dehnungsreizen [158,159] dazu bei, die intrazelluläre Kalziumkonzentration in Muskelfasern mit intakter Muskelfasermembran zu erhöhen.

Es kommt zur Degeneration von Muskelfasern, Muskelfasernekrosen, zum vermehrten Auftreten von resorptiven und chronischen Entzündungsprozessen, einer beginnenden Regeneration der Muskelfasern und zu einer zunehmenden Fibrose und Lipomatose. Der binde- und fettgewebige Ersatz von Muskelzellen führt zu einer zunehmenden Funktionsstörung der betroffenen Muskeln [4,8]. Beim Menschen manifestieren sich die ersten Symptome der DMD im Alter von zwei bis drei Jahren, die betroffenen Jungen haben Schwierigkeiten beim Laufen und beim Treppen steigen. Die im Serum nachweisbaren Konzentrationen von CK sind um ein Vielfaches erhöht. Die Muskelschwäche schreitet progressiv voran und führt in den meisten Fällen zum vollständigen Verlust der Geh- und Stehfähigkeit vor dem Erreichen des 12. Lebensjahrs [4]. In der zweiten Lebensdekade kommt es aufgrund der Muskelschwäche zunehmend zu Ateminsuffizienz [4]. Trotz Behandlung der respiratorischen Einschränkungen wird die Lebenserwartung im weiteren Verlauf, durch die zunehmende kardiale Insuffizienz, erheblich verkürzt, so dass Betroffene in der Regel maximal ein Alter von 30 bis 40 Jahren erreichen [4,5,160].

Die Histopathologie spiegelt den biphasischen Verlauf von Muskelfaserdegeneration und Muskelfaserregeneration wider. Als Ausdruck der Muskelfaserdegenerationsprozesse treten im Gewebe starke Variationen der Muskelfaserdurchmesser, hypertrophe Muskelfasern und Fasern mit zentralständigen Zellkernen auf. Die Regeneration ist gekennzeichnet durch vermehrt auftretende Satellitenzellhyperplasie, Aufspaltung von Muskelfasern und Muskelknospenbildung. Im progressiven Verlauf ist diese dystrophe Myopathie durch Muskelfasernekrosen, interstitielle Fibrose und eine Infiltration mit Entzündungszellen gekennzeichnet [161,162].

Die Kardiomyopathie wird durch ähnliche Pathomechanismen hervorgerufen, wie sie auch zur generalisierten Muskelschwäche beitragen. Der Verlust von Dystrophin beeinflusst Kalziumkanäle der Kardiomyozyten und die mechanisch aktivierbaren Dehnungsrezeptoren im Herzmuskel, letztendlich trägt der erhöhte intrazelluläre Kalziumeinstrom durch die Aktivierung von Proteasen zu einer chronischen Entzündung und myokardialen Fibrose bei [159,160,163]. Das führt zu einem erhöhten Sauerstoffbedarf und erhöhter Belastung des verbleibenden Myokards [160].

Die Arbeitsbelastung des Myokards wird bei einzelnen Patienten durch höhere Lebenserwartung und möglicherweise auch durch einen verlängerten Erhalt der Gehfähigkeit, in Folge der Kortikosteroidgabe, noch gesteigert [160,164].

Ein geringer Teil der Patienten (circa 17 %) weist eine Beeinträchtigung in der kognitiven Entwicklung auf, es besteht ein erhöhtes Risiko für geistige Retardierung und unterdurchschnittliche IQ-Werte [14]. Das verbale Gedächtnis ist bei einigen DMD-Patienten beeinträchtigt [14,165]. Daneben kommen Veränderungen im Stoffwechsel vor, die bei einigen Patienten zu Überbeziehungsweise Untergewicht führen [5,15,142]. Die Patienten weisen ein erhöhtes Risiko für Hyperinsulinämie und Insulinresistenz auf, die möglicherweise mit einer veränderten Glukoseaufnahme im Muskel, aufgrund der veränderten Signaltransduktionsmechanismen im unvollständigen DGC Komplex, in Zusammenhang steht [24,142]. Außerdem treten bei circa 30 % der Patienten Wachstumsstörungen bis hin zu Kleinwüchsigkeit auf [12–14,24].

Für die meisten DMD-Patienten stehen bisher lediglich symptomatische Therapien zur Verfügung, die darauf abzielen das Voranschreiten der Erkrankung zu verlangsamen, die Lebensqualität der Patienten zu erhöhen und die Lebenserwartung zu verlängern. Die Gabe von Kortikosteroiden ist bislang die einzige symptomatische Therapie, die ein Voranschreiten der progressiven Muskelschwäche verzögert und die Muskelstärke fördert, so dass ein längerer Erhalt der Gehfähigkeit ermöglicht wird [9,10]. Vornehmlich kommt es zum Einsatz von „Prednison“ und „Deflazacort“, die auch zur Reduktion von auftretender Skoliose, zur Verbesserung der Lungenfunktion und zum Erhalt der Herzfunktion beitragen [9,166]. Allerdings birgt die frühzeitig begonnene, dauerhafte Therapie zahlreiche Nebenwirkungen, die unter anderem auch bestehende Symptome von Duchenne-Patienten verschlechtern, spezielle Risiken erhöhen und die Lebensqualität einschränken. Neben Gewichtszunahme und metabolischen Veränderungen, die die Insulinresistenz fördern [24], kommt es zu einer reduzierten Mineralisation der Knochen, die das Frakturrisiko stark erhöht [11]. Hinzu kommen ein verzögerter Eintritt in die Pubertät und ein gestörtes Längenwachstum [16,24]. Diese unerwünschten Nebeneffekte treten bei täglicher Kortikosteroidgabe im Vergleich zu intermittierender Verabreichung, häufiger auf [167].

Neben Kortikosteroiden werden zur Stärkung der Herzfunktion und zur Entlastung des Herzens auch ACE-Hemmer und β -Blocker eingesetzt [160].

An kurativen Therapien für DMD-Patienten wird intensiv geforscht und zu deren Erprobung werden verschiedene Tiermodelle der Erkrankung (Mäuse, Ratten, Kaninchen, Hunde und Schweine) eingesetzt [26,27,29]. Der gemeinsame Ansatz verschiedener neuer therapeutischer Strategien ist die partielle beziehungsweise vollständige Wiederherstellung der Dystrophin-Funktion, um eine phänotypische Verbesserung und mildere klinische Symptome ähnlich der, der Becker-Muskeldystrophie (BMD) zu erzielen. Nonsense Mutationen können in einigen Fällen mit „Ataluren“ unterdrückt werden, indem das Medikament dafür sorgt, dass das Stopcodon „überlesen“ wird und so die Translation an dieser Stelle fortgesetzt wird [6,168]. Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist das sogenannte *exon skipping*, bei dem versucht wird in der Transkription ein Exon nahe der Mutation zu überspringen, um auf diese Weise den Leserahmen wiederherzustellen. Hierfür kommen synthetische *antisense* Oligonukleotide (AON) zum Einsatz, die den Spleißing-Prozess so inhibieren, dass das entsprechende Exon nicht Teil der reifen mRNA wird. Dies führt zur Bildung eines kürzeren, dennoch stabilen und funktionellen Dystrophins [6,169]. Einige Medikamente mit diesem Ansatz befinden sich derzeit in klinischen Studien, seit 2016 ist in den USA das Medikament „Exondys51“ zugelassen [170,171]. Die Größe des *DMD* Gens erschwert einen vollständigen Ersatz mittels Gentherapie, da die Kapazität in adenoviralen Vektoren, die zur Einschleusung verwendet werden können, auf eine gewisse Anzahl an Basenpaaren begrenzt ist [172]. Neuere therapeutische Strategien bestehen häufig im Einbringen kleinerer Dystrophin Versionen, sogenannten Mikro-Dystrophinen in adenoassoziierte Viren (AAV), die in der Regel nicht selbst Bestandteil des Genoms werden [172]. Der neuste kurative Ansatz besteht in der dauerhaften Wiederherstellung des Leserahmens des *DMD* Gens, mit Hilfe der CRISPR-CAS 9 Technologie (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR). Dieses Verfahren bietet einen breiten Ansatz bei diversen Mutationen und birgt im Vergleich zum *exon skipping* durch AON das Potenzial eines Therapieerfolgs, nach nur einmaliger Anwendung [7,173].

Obwohl die Erforschung neuer kurativer Therapien stetig voranschreitet, kommt es immer wieder zu Rückschlägen und Herausforderungen durch Immunisierungseffekte gegen Vektoren und Genprodukte sowie Risiken durch ungewollt eingeführte Mutationen, die Veränderungen der endogenen Genexpression hervorrufen können [6,157,169,174].

2.2.2 Wachstumsstörungen bei DMD-Patienten

DMD-Patienten weisen bei der Geburt normale Gewichte und Körpergrößen auf, später entwickeln sie jedoch häufig ein atypisches, verlangsamtes Körperwachstum. Im Vergleich zu gleichaltrigen Kindern wachsen DMD-Patienten, innerhalb der ersten Lebensjahre deutlich langsamer und erreichen auch als Erwachsene selten die erwartete Körpergröße [11–14,16]. Eine Mehrheit der DMD-Patienten liegt bezogen auf die bis zu einem Alter von 18 Jahren erreichte Körpergröße, unterhalb der 5. Perzentile [24]. Bis zu 30 % der DMD-Patienten gelten per Definition als kleinwüchsig, da sie unterhalb der 3. Perzentile im Vergleich zu gleichaltrigen Kindern liegen. [14,106,111,175]. West *et al.* [15] ermittelten in einer 2013 publizierten, retrospektiven Studie mit 513 steroid-naiven Jungen, dass Kinder mit DMD im Alter von zwei bis zwölf Jahren verglichen mit gleichaltrigen Kindern einen durchschnittlichen Größenunterschied von 4,3 cm aufwiesen [15,24]. Die ermittelten Wachstumskurven von DMD-Patienten bis zum Alter von zwölf Jahren liegen durchweg unter denen von gesunden gleichaltrigen Kindern [15,176]. Insbesondere die DMD-Patienten, deren Körpergröße unterhalb der 10. Perzentile (verglichen mit gleichaltrigen DMD-Patienten) liegt, sind dabei signifikant kleiner als die kleinsten 10 % der gesunden Kinder [15]. Wachstumsstörungen und Kleinwüchsigkeit sind daher ein bekanntes Phänomen der Duchenne-Muskeldystrophie, welches sowohl in der westlichen als auch der östlichen Hemisphäre auftritt [12–14,24,177]. Wachstumsstörungen, die bereits bei steroid-naiven Patienten auftreten, werden durch den kontinuierlichen Einsatz von Kortikosteroiden, die den progressiven Krankheitsverlauf abmildern sollen, weiter verstärkt [14,16,178]. Rutter *et al.* ermittelten 2012 bei DMD-Patienten, die regelmäßig Kortikosteroide erhielten, eine durchschnittliche Wachstumsrate von $1,5 \pm 0,3$ cm/Jahr [23]. In einigen Fällen sind die 13-15 jährigen Kinder mit DMD 20-25 cm kleiner als der Durchschnitt [179]. Wong *et al.* [180] konnten 2017 in einer Untersuchung über die unerwünschten Langzeitnebenwirkungen von Kortikosteroiden bei DMD-Patienten feststellen, dass der Anteil der kleinwüchsigen Patienten nach jahrelangem therapeutischem Einsatz von Kortikosteroiden von knapp unter 10 % auf 72 % anstieg [11,180].

Kleinwüchsigkeit kann bei den Patienten ein erhöhtes soziales Stresslevel verursachen und negative Auswirkungen auf die psychosoziale Gesundheit, Lebensqualität und dadurch auch auf Behandlungsergebnisse haben [11,179]. Kortikosteroide hemmen das Wachstum auf komplexe Weise. Einerseits mutmaßlich an den Wachstumsfugen über die Hemmung der Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten sowie über die Förderung eines apoptotischen Effekts auf die Osteoblasten [181], andererseits wird die GH/IGF1-Achse gestört und es kommt zu einer Beeinträchtigung der GH-Sekretion und in der Peripherie zu einer GH- und IGF1-Resistenz [11,182,183]. Die Ursachen für das initial veränderte Wachstumsmuster bei DMD-Patienten sind bislang ungeklärt. Eine mögliche Ätiologie liegt in einer erhöhten metabolischen Aktivität, die aus dem biphasischen Verlauf von Muskelfaserdegeneration und Muskelfaserregeneration hervorgehen könnte. Valentine *et al.* [184] konnten 1990 in einer Studie an muskeldystrophen Hunden nachweisen, dass ein mangelndes Wachstum vor dem Einsetzen der klinischen Symptome mit einer Phase sichtbarer histopathologischer Veränderungen, bestehend aus hochgradiger Muskelnekrose und anschließenden Regenerationsprozessen, zusammenfiel [17,184]. Auch der geringere Grad an physischer Aktivität der Kinder, aufgrund eingeschränkter Mobilität und rascher Erschöpfung, könnte zu einer reduzierten Belastung der langen Röhrenknochen und einem geringeren Knochenumsatz und so zu einem verzögerten Wachstum beitragen [16,185]. Im dystrophen Mausmodell (mdx) führte eine geringere mechanische Stimulation zu einer Verkürzung des Femurs und zu Veränderungen im Knochenaufbau [186]. Bei einer Minderheit der DMD-Patienten existiert ein Zusammenhang zwischen der Kleinwüchsigkeit und einer zusätzlichen Mutation im *Short Stature Homeobox Gene (SHOX)*, welches auf einem dem Dystrophin benachbarten Genabschnitt des X-Chromosoms liegt und phänotypisch mit Minderwuchs assoziiert ist [13,187]. Ein primärer GH-Mangel wurde ebenfalls als Ursache für die Kleinwüchsigkeit der DMD-Patienten diskutiert. Nagel *et al.* [13] konnten 1999 in einer Studie mit 34 Patienten jedoch keine Veränderungen der Serumkonzentrationen von IGF1 und IGFBP3 feststellen [13]. Auch nächtliche, serielle Messungen von GH im Serum (in 20-minütigen Intervallen) zeigten kein verändertes Sekretionsmuster von GH [188].

Im Anschluss an die Gabe von L-Dopa (GH-Provokationstest) konnten nur in Einzelfällen leicht abgeschwächte GH-Spitzenwerte gemessen werden [188,189]. Eine veränderte Reaktion des dystrophen Muskels auf endogenes GH konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden. Zur Erforschung potenzieller Veränderungen im endokrinen System auf struktureller Ebene im muskeldystrophen Golden Retriever Modell (GRMD), widmete sich eine Studie von de Lima *et al.* aus dem Jahr 2007 [30] der quantitativ-stereologischen Untersuchung der Hypophyse von GRMD-Hunden. Diese Untersuchung ergab Hinweise auf eine veränderte GH-Sekretion in Form von signifikant niedrigen Serum-IGF1-Konzentrationen und einem signifikant erhöhten Volumen der sekretorischen GH-Granula pro einzelner somatotroper Zelle in der Adenohypophyse der muskeldystrophen Hunde im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren [30]. Zusätzlich könnte Dystrophin selbst eine Rolle im Wachstumsprozess spielen, da DMD-Patienten mit einer veränderten Expression der Dystrophin Isoform Dp71 besonders häufig von Kleinwüchsigkeit betroffen sind [12,14]. In Zellkulturen zeigte sich eine Beteiligung des Dp71 in der Regulation des Zellzyklus [190] und in der mitochondrialen Funktion eines dystrophen Mausmodells [191]. Dp71, das normalerweise ubiquitär im Körper vorkommt, könnte somit eine Rolle bei der Kleinwüchsigkeit von DMD-Patienten spielen [12,149].

In Kombination mit einer Gewichtszunahme, die bei einigen DMD-Patienten häufig durch die Gabe von Kortikosteroiden auftritt und einem folglich erhöhten Body-Mass-Index (BMI), kann eine reduzierte Körpergröße, die Beweglichkeit einschränken und somit das Risiko für Stürze und Knochenbrüche erhöhen [5,16,24,167].

2.2.3 Zusammenhang zwischen Wachstumsstörungen und dem Krankheitsverlauf von DMD-Patienten

Obwohl Wachstumsstörungen bis hin zu Kleinwüchsigkeit bei DMD-Patienten ein bekanntes Phänomen darstellen, das bis zu 30 % betrifft, herrscht Unklarheit darüber, ob und auf welche Weise ein reduziertes Wachstum einen Einfluss auf den progressiven Krankheitsverlauf der Duchenne-Muskeldystrophie hat [14,16]. Während ausgeprägte Kleinwüchsigkeit insbesondere in Kombination mit einem erhöhten Körpergewicht die mechanische Belastung an den Muskeln steigert und damit einen schädlichen Effekt auf die Muskulatur von DMD-Patienten haben könnte, wäre ein reduziertes Wachstum allein, aufgrund der geringeren mechanischen Belastung, ein Vorteil, um die Geh- und Stehfähigkeit möglichst lange zu erhalten [21]. In einem mathematischen Modell konnten Bodor und McDonald im Jahr 2013 [21] das Verhältnis von Muskelkraft zur Körpergröße, anhand der Muskelfaserdurchmesser unter Miteinbeziehung der steigenden Belastung auf das Sarkolemm bei DMD-Patienten, simulieren [21]. Dieses Modell ergab, für einen angenommenen Verlust von jährlich 5 % der Muskelfasern über 18 Jahre, einen exponentiellen Rückgang der Mobilität bei zunehmender Körpergröße [21]. Da Dystrophin normalerweise eine wichtige strukturelle Komponente ist, trägt die strukturelle Schwäche der Muskelfasern der DMD-Patienten dazu bei, dass durch eine Zunahme der Körpergröße und ein steigendes Körpergewicht die Belastung auf die Muskelfasern zunimmt und Schäden an der Muskelfasermembran begünstigt werden. Mit zunehmender Körpergröße kann der Verlust der Muskelfasern schließlich nicht mehr durch die Regenerationsprozesse kompensiert werden [21].

Diese Theorie wird aus den Beobachtungen in muskeldystrophen Tiermodellen verschiedener Spezies (Hunde, Schweine und Kaninchen) gestützt, bei denen eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der klinischen Symptome und dem Körpergewicht nachgewiesen wurde [26]. Verschiedene dystrophe Mausmodelle wiesen hingegen keine, beziehungsweise mildere klinische Anzeichen der Muskeldystrophie auf [26,27] (siehe Abschnitt 2.2.5).

In einigen Fallberichten über DMD-Patienten, bei denen zusätzlich ein Wachstumshormonmangel nachgewiesen wurde, kam es zu einem verzögerten Krankheitsverlauf der DMD. Zatz *et al.* [22] veröffentlichten 1981 den Fall eines 13-jährigen Jungen, der sowohl an DMD als auch an einer GHD unbekannter Genese erkrankt war und eine Körpergröße von 102 cm aufwies [22]. Im Gegensatz zu seinen männlichen Verwandten mit unbeeinträchtigtem Wachstum, die ebenfalls von der Duchenne-Muskeldystrophie betroffen waren, behielt der Junge die Geh- und Stehfähigkeit über das 12. Lebensjahr hinaus und zeigte einen deutlich milderen Verlauf der Erkrankung [22,188]. Ghafoor *et al.* [192] berichteten 2003 über einen Patienten, der in Folge der Behandlung einer GHD unbekannter Genese, mit GH, Muskelschwächesymptome entwickelte [192]. Kurz darauf konnte bei diesem Patienten eine Duchenne-Muskeldystrophie diagnostiziert werden [192].

Chronische Entzündungsprozesse, wie sie bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen vorkommen (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa), können einen negativen Einfluss auf die GH-Sensitivität ausüben. Zum einen über die Regulation der GHR-Expression, zum anderen durch Veränderungen in den GH vermittelten intrazellulären Signalkaskaden [49,111]. Ähnliche Prozesse der erworbenen GH-Resistenz durch chronische Entzündungsprozesse könnten auch eine Rolle bei der Duchenne-Muskeldystrophie spielen. Neben dem entzündungshemmenden Effekt von Kortikosteroiden [16,178] kommt auch ihr wachstumshemmender Effekt (siehe Abschnitt 2.2.2) dafür in Betracht, einen Beitrag zur Verzögerung der Progression der Muskeldystrophie zu leisten [16,21].

Aufgrund des unklaren, aber möglicherweise positiven Einflusses eines verlangsamten Wachstums auf den Krankheitsverlauf, ergab sich der therapeutische Ansatz einer Behandlung mit Wachstumshormoninhibitoren [21,22].

2.2.4 Therapeutischer Einsatz von Wachstumshormon und Wachstumshormon-Antagonisten bei DMD-Patienten

Der von Zatz *et al.* [22] im Jahr 1981 veröffentlichte Fallbericht eines Jungen, der zusätzlich zu dem Defekt im *DMD* Gen einen Wachstumshormonmangel aufwies und eine deutlich geringer ausgeprägte klinische Symptomatik der Duchenne-Muskeldystrophie zeigte, wurde zum Ausgangspunkt für Studien, die die Erforschung eines potenziell günstigen Effekts von Wachstumshormoninhibitoren bei heranwachsenden DMD-Patienten zum Ziel hatten [22].

Die Studienlage bezüglich eines positiven Effekts des therapeutischen Einsatzes von rekombinantem humanem GH oder GH-Antagonisten bei DMD-Patienten stellt sich kontrovers dar.

Erste Ergebnisse einer über sechs Monate angelegten Studie, die neun Jungen mit DMD einschloss, die täglich mit dem Wachstumshormoninhibitor „Mazindol, (Sanorex®)“ behandelt wurden, wurde 1984 von Collipp *et al.* [20] veröffentlicht. Im Gegensatz zum Körpergewicht zeigte sich bei den Teilnehmern keine signifikante Reduktion des Längenwachstums und keine Veränderung der Muskelkraft. Eine signifikante Erhöhung der Konzentrationen von Selen und Glutathion-Peroxidase im Serum konnte nachgewiesen werden und ein potenziell abgemilderter Verlauf der DMD-Erkrankung bei langfristiger Therapie wurde nicht ausgeschlossen [20].

In einer Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie an zwei, sieben Jahre alten, eineiigen Zwillingen, die an DMD erkrankt waren konnten Zatz *et al.* (1986) [193], nach täglicher Gabe von Mazindol über ein Jahr hinweg feststellen, dass sich eine Verschlechterung des klinischen Bildes bei dem Kind, das ein Placebo erhalten hatte, einstellte. Im Gegensatz dazu, wies sein mit Mazindol behandeltes, etwas kleineres und leichteres Bruder, eine sich im Vergleich langsamer entwickelnde klinische Symptomatik ohne Mobilitäts-einschränkungen auf. Nach Provokationstests mit L-Dopa zeigte der behandelte Junge außerdem eine niedrige GH-Konzentration im Serum [193].

Coakley *et al.* [194] konnten 1988 hingegen in einer Studie mit fünf an DMD erkrankten Jungen keine konsistente Veränderung der GH-Sekretion nach Gabe von Mazindol nachweisen.

Die suppressive Wirkung auf die GH-Freisetzung, des ursprünglich als Appetitzügler eingesetzten Medikaments, wurde in Frage gestellt. Mazindol ist in der Lage die Konzentrationen von Dopamin und Noradrenalin im zentralen Nervensystem zu erhöhen [195] und zeigte in der Studie von Coakley *et al.* neben einem mangelnden Effekt auf die GH-Ausschüttung, unerwünschte psychische Nebeneffekte wie Ängstlichkeit und gesteigerte Aggressivität sowie eine gesteigerte Herzfrequenz in Ruhe und nach Belastung. Aufgrund der Resultate wurde der Einsatz von Mazindol bei DMD-Patienten von den Autoren nicht empfohlen [194].

Im Jahr 1989 untersuchten Zatz *et al.* den Einfluss unterschiedlicher Dosierungen von Mazindol und „Cyproheptadine“ auf die nächtliche GH-Ausschüttung von Duchenne-Patienten und konnten ebenfalls keinen konstanten und anhaltenden suppressiven Effekt auf GH nachweisen. Beide Medikamente erwiesen sich daher nicht als geeignet, um eine dauerhafte Hemmung des Wachstums, mit potenziell positiven Effekten auf den Krankheitsverlauf der DMD, hervorzurufen [188].

In einer groß angelegten Placebo-kontrollierten Studie an 83 DMD-Patienten zeigte Mazindol ebenfalls keine Verbesserung hinsichtlich der Muskelkraft der Patienten, während gleichsam unerwünschte Nebenwirkungen wie gastrointestinale Symptome und Verhaltensänderungen auftraten [196].

In einzelnen Fällen, in denen eine Duchenne- [197] beziehungsweise Becker-Muskeldystrophie [198] in Kombination mit einem nachweisbaren Wachstumshormonmangel vorlag, konnte jedoch keine Verschlechterung des Krankheitsverlaufs in Folge einer GH-Supplementierung festgestellt werden, sondern gute therapeutische Erfolge im Hinblick auf das Wachstum der Patienten erzielt werden.

In einer Studie von Yoon *et al.* aus dem Jahr 2019 [199] im mdx-Modell war die Administration von GH alleine und in Kombination mit Glukokortikoiden in der Lage die funktionelle Muskelstärke und den Schweregrad pathohistologischer Veränderungen im Muskel zu verringern, sowie die Expression der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 1 β (IL-1 β) im Muskel zu inhibieren.

Zusätzlich konnte eine Verbesserung der Knochenfestigkeit sowie eine Verbesserung biomechanischer Eigenschaften des Knochens auf der Basis anaboler GH-Effekte erzielt werden [199]. In einer Vorabstudie von Cittadini *et al.* aus dem Jahr 2002 [25] wirkte sich eine GH-Gabe über drei Monate positiv auf die systolische Herzfunktion aus, unter anderem durch eine Erhöhung der linksventrikulären Auswurfleistung von 16 Patienten mit Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie, die bereits eine Herzbeteiligung aufwiesen. Gleichzeitig konnten keine Nebenwirkungen und keine Veränderungen der Muskelfunktion im Verlauf der Therapie festgestellt werden [25]. In einer Studie aus dem Jahr 2012 zur Wirksamkeit und Sicherheit der Therapie mit GH untersuchten Rutter *et al.* [23] 39 an DMD erkrankte Jungen, die von einer kortikosteroidinduzierten Wachstumsstörung betroffen waren. Die Patienten wurden ein Jahr lang mit Wachstumshormon behandelt, worauf sich die Wachstumsgeschwindigkeit signifikant erhöhte. In dieser Zeit wurde kein schädlicher Effekt auf die neuromuskuläre Funktion festgestellt. Zusätzlich traten keine Veränderung in der Herz- und Lungenfunktion auf. Die Verträglichkeit der Therapie erschien überwiegend gut, wobei drei Patienten unerwünschte Nebeneffekte in Form von intrakranieller Hypertonie und Insulinresistenz entwickelten. Im Einzelfall wurde GH daher von den Autoren als mögliche Therapieoption für DMD-Patienten mit Wachstumsstörungen erwogen [23,179].

2.2.5 DMD-Tiermodelle

Zur Erforschung der Pathogenese der Duchenne-Muskeldystrophie und zur Erprobung neuer therapeutischer Strategien, wurden in der Vergangenheit verschiedene Dystrophin-defiziente Säugetiermodelle in der biomedizinischen Forschung eingesetzt [26]. Die verwendeten Tiermodelle unterscheiden sich dabei, sowohl im Hinblick auf die Art, den Locus und die Entstehung der *DMD* Genmutation, als auch im Hinblick auf die Art der phänotypischen Ausprägung der klinischen Symptome und hinsichtlich der histopathologischen Veränderungen [27]. Hieraus ergeben sich für die einzelnen Modelle individuelle Vorteile und Limitationen, die bei verschiedenen wissenschaftlichen Fragestellungen berücksichtigt werden müssen [26]. Neben Hunde-, Katzen- und Mausmodellen, die natürlich entstandene Mutationen im *DMD* Gen aufweisen [27,200], wurden auch genetisch modifizierte Mäuse-, Ratten-, Kaninchen- und Schweinemodelle der Erkrankung generiert [26,29,201]. Im Folgenden werden die gängigsten Säugetiermodelle der Duchenne-Muskeldystrophie sowie ihre Vor- und Nachteile, die es bei unterschiedlichen wissenschaftlichen Fragestellungen zu berücksichtigen gilt, aufgeführt.

2.2.5.1 DMD-Nagermodelle

Die Maus repräsentiert die am häufigsten zur Erforschung der Duchenne-Muskeldystrophie eingesetzte Säugetierspezies. Es existieren verschiedene dystrophe Mausmodelle (*mdx*). Ein weitverbreitetes und häufig zitiertes *mdx*-Modell weist eine Mutation im Exon 23 auf [202], ein weiteres, durch *gene targeting* generiertes Mausmodell, ist die *mdx52* Maus, welche eine Deletion im Exon 52 des *Dmd* Gens aufweist und somit genetisch einem häufigen Mutationstyp der menschlichen DMD-Erkrankung entspricht [203]. Die dystrophen Mausmodelle weisen wenige mit der menschlichen DMD-Erkrankung vergleichbare, charakteristische histopathologische Veränderungen (wie zum Beispiel hochgradige Muskelfibrose) und keine Kardiomyopathie auf. Mäuse zeigen eine mildere klinische Symptomatik, ohne die beim DMD-Patienten auftretenden Bewegungseinschränkungen und ihre Lebensspanne ist zudem, verglichen mit gesunden Mäusen, nicht verkürzt [26,27,201].

Ein deutlicheres klinisches Krankheitsbild zeigen mdx Mäuse, bei denen zusätzlich das Gen für Utrophin, ein autosomales Homolog von Dystrophin, deletiert ist (UtrophinKO). Utrophin ist, zumindest im dystrophen Mausmodell, in der Lage, eine Defizienz von Dystrophin teilweise zu kompensieren [27,204]. Obwohl mdx/UtrophinKO Mäuse einen ähnlichen klinischen Phänotyp im Vergleich zu menschlichen DMD-Patienten besitzen, sind sie zur Erprobung einiger Therapieansätze aufgrund der fehlenden Utrophin-Expression ungeeignet. Insbesondere therapeutische Strategien, die auf eine Erhöhung der Utrophin-Expression zur Verbesserung der klinischen Symptome abzielen, können an mdx/UtrophinKO Mäusen nicht sinnvoll erprobt werden. [26]. Dystrophe Mausmodelle eignen sich somit besonders zur Erforschung, von grundlegenden Mechanismen der Pathogenese und von früh im Krankheitsverlauf der DMD auftretenden histopathologischen Veränderungen. Gleichzeitig ist ihr Einsatz bei der Erforschung von fortgeschrittenen Krankheitsverläufen und in der Erprobung klinischer Therapien aufgrund des wenig ausgeprägten klinischen Phänotyps der Erkrankung und durch die vom Menschen stark abweichenden physiologischen Eigenschaften der Mäuse entsprechend limitiert [26].

Sowohl Nakamura *et al.* [205] als auch Larcher *et al.* [206] gelang es 2014 ein Rattenmodell der DMD-Erkrankung mit Hilfe der CRISPR/CAS 9 Technologie [205] beziehungsweise durch den Einsatz von künstlichen sequenzspezifischen Restriktionsenzymen, sogenannten Transkriptionsaktivatorartige Effektor-nukleasen, *transcription activator-like effector nucleases* (TALEN) [206], gezielt zu generieren. Die so entstandenen Rattenmodelle wiesen, verglichen mit herkömmlichen Mausmodellen, einen ausgeprägteren klinischen Phänotyp der Muskelschwäche und in einigen Fällen eine funktionelle Kardiomyopathie auf. Histopathologisch waren charakteristische Fibrose und Lipomatose in der Skelettmuskulatur vorhanden. Die Rattenmodelle bieten theoretisch ein großes Potenzial für therapeutische Entwicklungen, auch wenn bislang keine weiteren Studien mit diesen Modellen vorliegen [26,205,206].

2.2.5.2 DMD-Hunde- und Katzenmodelle

Bei bestimmten Zuchtlinien verschiedener Hunderassen (unter anderem Golden Retriever, Rottweiler und Deutsch Kurzhaar) kommt es durch spontane Mutationen im *DMD* Gen zu einer, durch Dystrophinmangel bedingten, degenerativen Myopathie [207,208]. Die *Golden Retriever Muscular Dystrophy* (GRMD) ist eine besonders eingehend untersuchte Form, die bei Golden Retrievern durch eine spontane *splice site* Mutation ausgelöst wird und zum Verlust des Exon 7 im *DMD* Gen führt [31]. Obwohl sich das GRMD-Modell nicht in der gleichen Weise für genetische Modifikationen und für die Haltung unter Laborbedingungen eignet, wie die etablierten Nagermodelle, wird es aufgrund seiner ähnlichen physiologischen Voraussetzungen, bezogen auf Körpergewicht und -größe, häufig als translationales Modell der humanen DMD-Erkrankung eingesetzt [200]. Die betroffenen Golden Retriever entwickeln zum Teil ein ausgeprägtes, mit menschlichen Patienten vergleichbares, klinisches Bild mit progressiver Muskelschwäche, Kontrakturen und eingeschränkter respiratorischer Funktion. Ähnlich wie bei menschlichen DMD-Patienten sind die CK-Konzentrationen im Serum der Hunde erhöht und histopathologisch treten charakteristische Veränderungen der Skelettmuskulatur auf, die Degenerations- und Regenerationsprozesse der Muskelfasern umfassen [209]. Im GRMD-Modell sind verschiedene Muskelgruppen unterschiedlich schwer betroffen, z.B. ist der kraniale Anteil des Schneidermuskels (*Musculus sartorius, Pars cranialis*) häufig in geringerem Umfang von Atrophie betroffen. Die ungleichmäßige Hypertrophie dieses Muskels geht im GRMD-Modell mit einer schwereren klinischen Symptomatik einher, wobei eine starke individuelle Variabilität zwischen den einzelnen Hunden existiert [209,210]. Zusätzlich tritt bei den Hunden häufig eine Hypertrophie der Zunge auf, die mit einer pharyngealen und ösophagealen Funktionsstörung einhergeht und vermehrt zu Dysphagie und Regurgitieren führt [200]. Golden Retriever sind aufgrund ihrer Größe aufwändiger in der Haltung unter Laborbedingungen und weisen niedrige Reproduktionsraten im Vergleich zu Nagermodellen auf. Dies und die hohe Sterblichkeit der GRMD-Welpen führt dazu, dass nur kleine Tierzahlen in experimentellen Studien mit dem GRMD-Modell zur Verfügung stehen [26,200]. Hinzu kommen ethische Bedenken bezüglich Hunderversuchen [211]. Bei der Erprobung kurativer therapeutischer Strategien kommt erschwerend hinzu, dass es eine ausgeprägte Variabilität der klinischen Erscheinung zwischen

verschiedenen erkrankten Hunden gibt und es daher schwierig ist, statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten [26,212,213]. Ein weiteres Hundemodell (deltaE50-MD) basiert auf dem Fall eines Cavalier King Charles Spaniel. Dieser initiale Fall wurde 2010 von Walmsley *et al.* [214] veröffentlicht und am Royal Veterinary College (Vereinigtes Königreich, London) wurde eine verwandte Hündin, die Trägerin der Erkrankung war, in eine Beagle-Linie eingekreuzt [214]. Die vererbte *splice site* Mutation führt zum Verlust des Exon 50 im mRNA Transkript und in der Translation zu einem verkürzten Dystrophin [214]. Das als deltaE50-MD-Modell bezeichnete Modell weist einen häufig beim Menschen vorkommenden Mutationsschwerpunkt auf und scheint, im Vergleich zum GRMD-Modell, ein Hundemodell mit einem weniger variablen Phänotyp der Erkrankung, mit klarer klinischer Symptomatik und einer reduzierten Jungtiersterblichkeit, darzustellen [26,214].

Es existieren Berichte über sporadische Fälle von Muskeldystrophien von Katzen, bei denen eine zugrunde liegende Mutation im *DMD* Gen und ein daraus resultierender Dystrophinmangel vermutet wurde [200,215]. Katzen weisen einzigartige klinische Symptome auf, die eine Hypertrophie der Schulter- und Nackenmuskulatur beinhaltet. Hinzu kommen häufig ein Megaösophagus und eine Hypertrophie der Zunge, welche die Nahrungsaufnahme behindern. Die Erkrankung ist bei Katzen weniger gut charakterisiert. Katzen gelangen daher seltener zum Einsatz als Modell zur Erforschung der menschlichen DMD-Erkrankung [26,200].

2.2.5.3 DMD-Kaninchenmodell

Ein mittels CRISPR-Cas 9 Technologie generiertes Kaninchenmodell der DMD-Erkrankung wurde 2018 von Sui *et al.* veröffentlicht [216]. Durch die gezielte genetische Modifikation des Exon 51 des *Dmd* Gens, einem Locus, in dem bei menschlichen DMD-Patienten häufig Mutationen gefunden werden, gelang es, die Expression von Dystrophin zu unterbinden [216]. Die betroffenen Tiere zeigten eine starke Bewegungseinschränkung [216]. Die Skelettmuskulatur der Tiere wies typische histopathologische Veränderungen wie Größenvariation der Muskelfaserdurchmesser, Muskelfasern mit zentralständigen Zellkernen sowie binde- und fettgewebigen Ersatz von Muskelzellen auf.

Die erkrankten Kaninchen zeigten darüber hinaus Anzeichen einer funktionellen Kardiomyopathie, mit verringerter linksventrikulärer Auswurfleistung, im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren und wiesen korrespondierend hierzu histopathologische Veränderungen, in Form von interstitieller Fibrose am Herzen auf [216]. Somit könnten die Kaninchen ein interessantes Modell für die Behandlung von funktionellen Herzveränderungen darstellen, die bei humanen DMD-Patienten eine häufige Todesursache darstellen [26]. Allerdings war die Sterblichkeitsrate, mit 40 % verstorbener Tiere bis zum Alter von vier Monaten, bei den muskeldystrophen Kaninchen verhältnismäßig hoch [216].

2.2.5.4 DMD-Schweinmodell

Am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU München gelang 2013 erstmals die Generierung eines porzinen Großtiermodells der Duchenne-Muskeldystrophie [28]. Hierbei wurde mittels *gene targeting* das Exon 52 des porzinen *DMD* Gens in einem künstlichen Bakterienchromosom (*bacterial artificial chromosome*, BAC) mit Hilfe homologer Rekombination durch eine Antibiotikaresistenzkassette ersetzt. Im Anschluss wurden die BAC's mittels Nukleofektion in primäre Nierenzellen transfiziert und selektiert. Diejenigen Zellklone, welche einen Verlust des Exons 52 aufwiesen, wurden für den Kerntransfer (*somatic cell nuclear transfer*, SCNT) eingesetzt und so die ersten Dystrophin-defizienten Ferkel generiert [28]. Die so erzeugte Mutation, entstand in dem beim Menschen am häufigsten betroffenen Lokus des *DMD*-Gens, der klinisch zu einer DMD-Erkrankung führt. DMD-Schweine zeigen eine bereits sehr früh einsetzende reduzierte Mobilität, signifikant bis zu 10-fach erhöhte Serum-CK-Konzentrationen im Vergleich zu Kontrolltieren und eine hochgradig ausgeprägte, generalisierte Muskelschwäche. DMD-Schweine entwickeln ein breites Spektrum an klinischen Symptomen und progressiven, morphologischen Skelettmuskelalterationen, wie große, abgerundete, hypertrophe Muskelfasern, degenerative Veränderungen, abschnittsweise nekrotische Muskelfasern, Infiltration mit Entzündungszellen und interstitielle Fibrose, daneben Anzeichen von Regenerationsprozessen wie zum Beispiel Muskelknospenbildung [28]. Die histopathologischen Läsionen der Skelettmuskulatur sowie die auf Transkriptom- und Proteomebene detektierbaren Veränderungen weisen ebenfalls weitreichende Parallelen zu entsprechenden Alterationsmustern beim Menschen auf [28,217].

DMD-Schweine zeigen in der Proteomanalyse eine Verschiebung von schnellkontrahierenden Typ II Muskelfasern hin zu langsam kontrahierenden Typ I Muskelfasern [217]. Zusätzlich konnte in diesem Modell eine negative Korrelation zwischen Geburtsgewicht und Lebenserwartung der Tiere festgestellt werden [28]. Im Alter von drei Monaten war das Körpergewicht von DMD-Schweinen im Vergleich gleichaltrige Kontrolltieren signifikant um die Hälfte reduziert [28]. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund der oben genannten Theorie von Bodor und McDonald aus dem Jahr 2013 [21] interessant, nach der ein rasches Körperwachstum und die damit verbundene Gewichtszunahme zu einem höheren Maß an Muskelzerstörung führen könnte (siehe Abschnitt 2.2.3) [21]. Der Krankheitsverlauf erscheint bei DMD-Schweinen, im Vergleich zu Menschen akzeleriert zu sein [28].

Schweinemodelle eignen sich generell in besonderem Maße für die translationale biomedizinische Forschung, da sie große Ähnlichkeiten im Bezug auf anatomische und physiologische Charakteristika, im Vergleich zum Menschen, aufweisen [218]. Das Immunsystem und die Ernährungsphysiologie der Schweine weisen eine weitreichende Vergleichbarkeit mit dem des Menschen auf [29]. Ein weiterer Vorteil für den Einsatz von Schweinen in der biomedizinischen Forschung, sind ihre vergleichsweise hohen Reproduktionsraten und kurzen Generationsintervalle [26,28,218]. Im Anschluss an die oben beschriebene Entwicklung des porzinen DMD-Modells mit Hilfe von SCNT, konnte eine Zucht des Tiermodells, mit weiblichen heterozygoten *DMD* Träger-Tieren etabliert werden [7]. Die Möglichkeit der Zucht gestattet, mit einem geringeren Aufwand im Vergleich zum SCNT, die Verwendung des porzinen DMD-Modells in Studien zu kurativen Therapieansätzen z.B. durch gezielte Modifikation mit CRISPR-CAS 9 [7] oder in Studien zur Diagnostik mit modernen Verfahren, wie der Multispektralen optoakustischen Tomografie, *multispectral optoacoustic tomography* (MSOT) [219].

Somit stellt das DMD-Schwein ein wertvolles Tiermodell zur weiteren Erforschung der Pathogenese der DMD und -assoziierter Folgeerkrankungen sowie zur Entwicklung und zur Erprobung neuer therapeutischer Strategien und Ansätze dar [7,28,29].

2.3 Quantitative Stereologie

Der Begriff Stereologie stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus den Wörtern „*stereos*“ = „fest, räumlich, körperlich“ und „*logos*“ = „Theorie, Lehre“ zusammen. Diese sogenannte Raumlehre umfasst alle Methoden, die auf der Basis von zweidimensionalen Schnittbildern (z.B. von Schnittprofilen, planaren Projektionen) die Interpretation der dreidimensionalen Struktur eines Objekts ermöglichen [220]. Die dreidimensionale Rekonstruktion kann sich hierbei sowohl auf qualitative als auch auf quantitative Aspekte beziehen. Der häufig synonym verwendete Begriff „Morphometrie“, im Sinne einer „Gestaltmessung“, hebt ausschließlich Aspekte der quantitativen Erfassung morphologischer Strukturen hervor, ohne dabei zwingend Informationen über die Dreidimensionalität von Objekten zu vermitteln [220,221]. In der quantitativen Stereologie werden, basierend auf stochastischer Geometrie, mit Hilfe von statistischen Verfahren zur Stichprobengewinnung, erwartungstreue Schätzwerte quantitativ-morphologischer Parameter von dreidimensionalen Objekten erhoben (zum Beispiel Volumina, Längen, Oberflächen und Partikelzahlen) [222–226].

2.3.1 Quantitativ-stereologische Analyse biologischer Gewebeproben

Quantitativ-stereologische Methoden kommen in zahlreichen naturwissenschaftlichen Disziplinen zur Anwendung (Geologie, Materialwissenschaften und Ingenieurwissenschaften) [220]. In der Biologie und Medizin können mit ihrer Hilfe anhand von zweidimensionalen histologischen Gewebepreparaten, dreidimensionale Strukturen innerhalb von Organen/Geweben quantitativ analysiert werden [225–227]. Mit Hilfe quantitativ-stereologischer Analysen können so zum Beispiel relevante Informationen über das Volumen der Inseln im Pankreas [228,229] die Länge der Glomeruluskapillaren in den Nierenkörperchen [51] die Dicke der Basalmembran in den Lungenalveolen [230], die Oberfläche des Dünndarmepithels [231] oder über die Anzahl der somatotropen Zellen in der Adenohypophyse [32] gewonnen werden [220,225,232].

Erstmals 1961 erwähnt, erlebte die quantitative Stereologie, als interdisziplinäre Wissenschaft eine rasante Entwicklung [233]. Einerseits durch den Fortschritt der Mikroskopietechnik, andererseits durch die Entwicklung von einfachen modellbasierten stereologischen Methoden hin zu modellunabhängigen (*design-based*) stereologischen Methoden, die als moderne Methoden der Wahl im Hinblick auf eine erwartungstreue Schätzung gelten [221,225,232,234,235].

Das visuelle System des Menschen stellt die Grundlage für die Beurteilung histopathologischer Veränderungen dar. Dieses ist bei der Erkennung von Mustern überaus leistungsfähig, gerät aber, wenn es um die Erfassung quantitativer Merkmale, wie zum Beispiel die Erfassung von Größen und Anzahlen geht, an seine Grenzen [220,221]. Selbst im direkten Vergleich werden quantitative Unterschiede, je nach Gewebeart, erst dann vom Untersucher erkannt, wenn eine Abweichung von 25-40 % besteht [224–226]. Zur genauen Erfassung von zum Teil subtilen, nicht mit bloßem Auge wahrnehmbaren, aber möglicherweise pathogenetisch hochrelevanten quantitativ-morphologischen Alterationen ist der Einsatz von sensitiven morphometrischen Methoden unverzichtbar [224,225].

Die mit diesen Methoden gewonnenen, quantitativ-stereologischen Daten sind reproduzierbar, erwartungstreu und präzise. Quantitativ-stereologische Methoden ermöglichen eine objektive Beurteilung des Schweregrades histopathologischer Veränderungen und bilden eine Grundlage für deren statistische Auswertung [236]. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch die Generierung eines messbaren, strukturellen Pendantes zu funktionellen Messergebnissen, das sich bei der Interpretation der Ergebnisse umfangreicher Genexpressions- und Proteomanalysen als besonders wertvoll erweisen kann [220]. Durch die Detektion von kleinsten strukturellen Veränderungen können außerdem bei chronischen pathogenetischen Prozessen, genauere Erkenntnisse über den exakten Beginn von Veränderungen und die Geschwindigkeit ihres Voranschreitens gewonnen werden [236,237]. Die Möglichkeit pathologische Prozesse auf diese Art zu charakterisieren, findet beispielsweise Anwendung bei der Beschreibung des Phänotyps genetisch modifizierter Modellorganismen [37,51,228,238].

2.3.2 Stereologische Prinzipien und Strukturparameter

Mit Hilfe modellunabhängiger („design based“) quantitativ-stereologischer Verfahren werden erwartungstreue, das bedeutet, nicht mit einem systematischen Fehler behaftete, quantitative Schätzungen erhoben, die sich auf das gesamte dreidimensionale Organ und die enthaltenen Strukturen wie beispielsweise Volumina, Längen, Oberflächen und Partikelzahlen beziehen [225]. Anders als bei modellbasierten quantitativ stereologischen Verfahren, bei denen Annahmen zur geometrischen Gestalt, der zu quantifizierenden Strukturen getroffen werden [239,240], hängen moderne modellunabhängige quantitativ-stereologische Methoden lediglich von einem repräsentativen Stichprobenverfahren ab, welches vorausschauend konzipierte Studienprotokolle mit repräsentativen Probennahmestrategien voraussetzt. So können auf der Basis zweidimensionaler Schnittpräparate, erwartungstreue Schätzungen, mit bekannter Fehlerwahrscheinlichkeit des Schätzergebnisses erzielt werden [225,232,241].

Die wissenschaftliche Stärke modellunabhängiger, quantitativ-stereologischer Methoden bei der quantitativen Erfassung von Daten geometrischer Strukturen, liegt in der hohen Genauigkeit, mit der diese Schätzungen dem wahren Wert entsprechen. Da im Rahmen biologischer Fragestellungen der wahre Wert einer Population in der Regel nicht bekannt ist und selten eine vollständige Datenerhebung erfolgen kann, basieren Rückschlüsse auf die Grundgesamtheit grundsätzlich auf Stichproben [232]. Daher kommt der Genauigkeit einer Untersuchung, die durch die Wiederholungsgenauigkeit (Präzision) und die Freiheit von systematischen Fehlern (Erwartungstreue) bestimmt wird, eine große Bedeutung zu. Um die Freiheit von systematischen Fehlern im Rahmen von quantitativ-stereologischen Untersuchungen zu gewährleisten sind repräsentative Probennahmeverfahren und adäquate Einbettungsmethoden unerlässlich [225,232,242].

Auf allen Ebenen einer Untersuchung, beginnend mit der Auswahl der Lokalisationen für die Entnahme von Gewebeproben, über die Auswahl der zu untersuchenden histologischen Gewebeschnitte, bis hin zur Auswahl der mikroskopischen Gesichtsfelder, die im Rahmen einer Studie ausgewertet werden sollen, wird ein übergeordneter systematisch zufälliger Plan zur Probennahme (*systematic uniform random* (SUR)) angewandt. Dies verhindert eine willkürliche Probennahme durch den Untersucher und gewährleistet die Repräsentativität der Stichproben [232,243–245].

Bei der Beurteilung von dreidimensionalen Organstrukturen anhand zweidimensionaler Schnittpräparate kommt es zum Verlust qualitativer Informationen bezogen auf die ursprünglich dreidimensionale Struktur, während quantitative Informationen mit Hilfe von geeigneten Methoden abgeleitet werden können. Die Rekonstruktion dieser dreidimensionalen Strukturinformation ist komplex und beinhaltet einige Schwierigkeiten. Im histologischen Schnitt sind ehemals dreidimensionale Strukturen, wie zum Beispiel Zellen, nur noch als zweidimensionale Zellprofile erkennbar [241]. Volumina stellen sich als Flächen, Flächen als Längen, Längen als Schnittpunkte dar. Für Partikelzahlen gibt es im zweidimensionalen histologischen Schnitt kein geeignetes Pendant. Dies hat zur Folge, dass unterschiedliche Strukturen, abhängig von der Schnittführung im zweidimensionalen Profil identisch erscheinen können, während identische Strukturen sich als unterschiedliche Profile darstellen können [232] (Abbildung 6).

Um absolute Partikelzahlen, Längen, Oberflächen oder Volumina zu ermitteln, werden in der Regel Kenntnisse über das gesamte Referenzkompartiment, zum Beispiel das zu untersuchende Organ benötigt, da der direkte Vergleich von Relativwerten (Dichten) irreführend sein kann (*reference trap*). Daher muss das Volumen des gesamten analysierten Referenzkompartiments (Organs/Gewebes) im Vorfeld bestimmt werden [225,246]. Der Veränderung des Referenzkompartiments kommt eine entscheidende Rolle bei der Bewertung von numerischen Volumendichten zu.

Wenn das Volumen des Referenzkompartiments, das eine Zielstruktur enthält, entsprechend abnimmt, erhöht sich die numerische Volumendichte dieser Struktur im histologischen Schnitt, obwohl sich in Wirklichkeit die absolute Anzahl der Struktur nicht verändert hat [220,225,247,248]. Das Volumen eines Referenzkompartiments kann beispielsweise mit Hilfe des archimedischen Prinzips (Submersionsmethode) [249] oder nach dem Prinzip von Cavalieri [225] bestimmt werden (siehe Abschnitt 4.4.2).

Die Strukturparameter werden zunächst als Relativwerte ermittelt, die definiert sind als Anteile einer Zielstruktur an einem Referenzkompartimentvolumen, wie zum Beispiel als Volumendichten-, Längendichten, Oberflächendichten, sowie numerische Volumendichten [225,227,236].

Aus diesen Relativwerten (Dichten) können durch Multiplikation mit dem Referenzvolumen entsprechende Absolutwerte (Volumen, Länge, Oberfläche und Partikelzahl) als relevante Zielgrößen abgeleitet werden. Zur quantitativ-stereologischen Analyse der verschiedenen Strukturparameter werden jeweils geeignete stereologische Testsysteme angewendet. Sie bestehen je nach untersuchtem Parameter aus Testpunkten, Testebenen, Testlinien oder Testvolumina [225,232,248] (Abbildung 6).

Die Randomisierung der räumlichen Orientierung der Probe spielt eine wichtige Rolle bei der Ermittlung von Längen und Oberflächen und generell, wenn richtungsabhängige (anisotrope) Zielstrukturen untersucht werden. Hierfür müssen gleichförmig, ungerichtete (=isotrope), Anschnittsflächen mit zufälliger Orientierung generiert werden, sogenannte *isotropic uniform random*, IUR Schnitte. Für größere Proben können die IUR-Schnitte mit Hilfe des „Orientator-Verfahrens“, durch die Kombination zweier zufällig gewählter Schnittebenen generiert werden [250–253]. Für kleinere Proben bietet sich das „Issector-Verfahren“ an, bei dem durch Rotation der Probe um eine zufällige Achse, eine zufällige Schnittfläche bestimmt wird [254]. Zur Bestimmung von Oberflächen werden bevorzugt sogenannte VUR-Schnitte, *vertical uniform random sections* (Schnitte mit gleichförmiger Zufälligkeit) eingesetzt, bei denen die Probe vor dem Anschnitt zufällig um eine vertikale Achse rotiert wird.

Auf diese Weise bleibt das vertraute Erscheinungsbild und die Orientierung der Gewebemorphologie für den Untersucher erhalten [225,253,255] (Abbildung 6).

Der Wahl des angewandten Probennahmeverfahrens und der verwendeten stereologischen Testsysteme kommt größte Bedeutung zu, da sich Fehler und Versäumnisse im experimentellen Design im weiteren Verlauf der Untersuchungen in der Regel nicht mehr rückgängig machen lassen [243,246].

Wenn die grundlegenden Anforderungen an eine repräsentative Stichprobennahme erfüllt sind, kann eine quantitativ-stereologische Analyse aussagekräftige, quantitative Beschreibungen der Geometrie von dreidimensionalen Strukturen, auf der Basis von Messungen zweidimensionaler Schnitte, liefern [226,256,257].

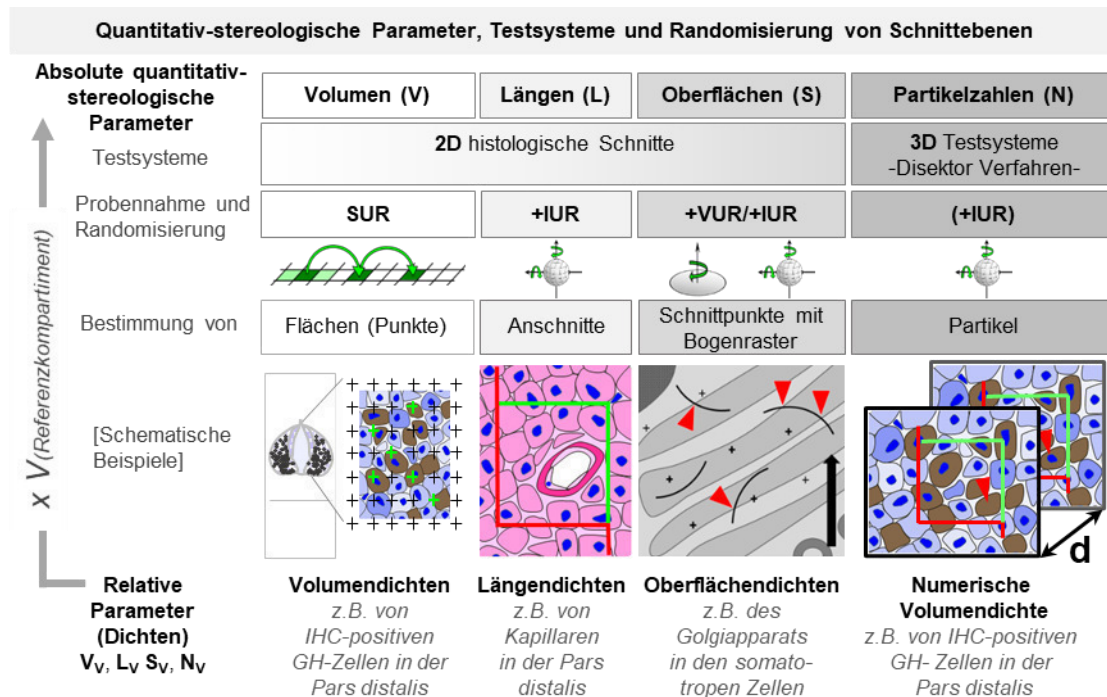


Abbildung 6: Quantifizierbare morphologische Parameter, stereologische Testsysteme, Stichprobennahmeverfahren und Randomisierung der Proben/Schnittausrichtung in modellunabhängigen, erwartungstreuen quantitativ-stereologischen Analysen. Volumendichten ($V_{V(\text{Zielstruktur/Referenzkompartiment})}$), Längendichten ($L_{V(\text{Zielstruktur/Referenzkompartiment})}$) und Oberflächendichten ($S_{V(\text{Zielstruktur/Referenzkompartiment})}$) werden in 2-D Schnitten systematisch-zufällig ausgewählter, *systematic uniform random* (SUR) Probenlokalisationen des Referenzkompartiments geschätzt. Die Volumendichten werden aus den, beispielsweise mit Punktzählverfahren bestimmten, Flächenverhältnissen der Anschnitte der Zielstruktur und des Referenzkompartiments im Schnitt abgeleitet [225]. Längendichten werden aus der Anzahl der Anschnittprofile der Zielstruktur mit der Schnittfläche geschätzt, hierfür werden ungerichtete (isotrope) Schnitte mit gleichförmiger Zufälligkeit, *isotropic uniform random sections* (IUR) benötigt. Zur Schätzung von Oberflächendichten wird die Anzahl der Schnittpunkte mit einem geeigneten Bogen- oder Linienraster ermittelt. Hierzu werden IUR-Schnitte beziehungsweise vertikale Schnitte mit gleichförmiger Zufälligkeit, *vertical uniform random sections* (VUR) verwendet. (Der schwarze Pfeil im gezeigten schematischen Beispiel bezeichnet die Orientierung der vertikalen Achse im VUR Schnitt). Die Schätzung von numerischen Volumendichten ($N_{V(\text{Zielstruktur/Referenzkompartiment})}$) erfordert dreidimensionale Testsysteme, wie z.B. physikalische Disektoren (siehe Abschnitt 2.3.3). Aus den jeweiligen Dichten und dem gesamten Volumen des Referenzkompartiments werden die absoluten Volumina, Längen, Oberflächen und Partikelzahlen ermittelt werden. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. Parzefall, Helmholtz Zentrum München, 2020.

2.3.3 Grundlagen des physikalischen Disektorverfahrens

Es ist nicht möglich, anhand der einfachen Zählung von Zellprofilen in zweidimensionalen Schnitten zu erwartungstreuen Schätzungen von absoluten Zellzahlen in den untersuchten Geweben zu gelangen. Durch die dimensionale Reduktion im zweidimensionalen Schnitt gibt es kein adäquates Pendant zu einer dimensionslosen Größe wie der Anzahl von Partikeln [225,232,241]. In zweidimensionalen Schnitten hängt die Anzahl und Größe der Zellprofile neben der numerischen Volumendichte der Zellen im gewählten Referenzkompartiment auch wesentlich von der Ausdehnung der Partikel senkrecht zur Schnittebene (orthogonale Linearprojektion), der Schnittdicke und bei anisotropen Strukturen, auch von der Orientierung der einzelnen Partikel relativ zur Schnittebene ab. Das hat beispielsweise zur Folge, dass größere Zellen im histologischen Schnitt prinzipiell mit einer höheren Wahrscheinlichkeit getroffen werden und daher gegenüber kleineren Zellen überrepräsentiert sind [220,225,232,258].

Eine Möglichkeit, zur erwartungstreuen Auswahl von Partikeln, unabhängig von ihrer Größe, Form, Verteilung und Orientierung, bietet das von einem Stereologen 1984 unter dem Pseudonym „Sterio“ publizierte physikalische Disektorverfahren [241]. Ein Disektor besteht aus einem dreidimensionalen Testvolumen, das sich aus dem Abstand zweier äquidistanter Serienschritte und dem Flächeninhalt eines erwartungstreuen Testfeldes zusammensetzt. Gezählt werden Partikel, wenn deren Schnittprofile durch das erwartungstreue Testfeld in der Ausgangsebene erfasst werden und gleichzeitig nicht von der Vergleichsebene geschnitten werden (Q^-) [241,247].

Eine schematische Darstellung des physikalischen Disektorverfahrens zur Ermittlung der numerischen Volumendichte von somatotropen Zellen in der Adenohypophyse findet sich in Abbildung 3 der Ergänzungen der Originalpublikation auf Seite 74 der vorliegenden Dissertationsschrift [32].

Zur Ermittlung der Schnittdicke von histologischen Präparaten, die im Rahmen eines Disektorverfahrens verwendet werden, existieren verschiedene Verfahren wie zum Beispiel die orthogonale Wiedereinbettung [259] oder moderne, berührungsfreie spektral reflektometrische Messverfahren [260].

Die Genauigkeit des physikalischen Disektorverfahrens hängt dabei wesentlich von der exakten Bestimmung der Schnittdicke ab, die eine Voraussetzung für die exakte Ermittlung der Disektorhöhe (h) darstellt [260]. Das physikalische Disektorverfahren stellt somit ein erwartungstreues, dreidimensionales Testsystem zur Ermittlung von numerischen Volumendichten partikulärer Strukturelemente unter Berücksichtigung der Schnittdicke dar [225,226,241]. Aufgrund der gängigen einbettungsbedingten Gewebeschrumpfung in Folge von Einbettung der Gewebeproben in Paraffin [224–226,242,261], wird bei Analysen mit dem physikalischen Disektorverfahren auf Kunststoffmedien (wie beispielsweise Epon) für den Einbettungsprozess zurückgegriffen [242,260,261]. Diese bieten zusätzlich den Vorteil einer exakten Erfassung der tatsächlichen Schnittdicke [260] der Semidünnschnittpräparate (circa 0,5- 1 μm).

3 PUBLIKATION

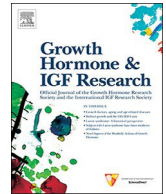
I. Hofmann, E. Kemter, N. Theobalt, S. Fiedler, M. Bidlingmaier, A. Hinrichs, M. Aichler, K. Burkhardt, N. Klymiuk, E. Wolf, R. Wanke, A. Blutke (2020). Linkage between growth retardation and pituitary cell morphology in a dystrophin-deficient pig model of Duchenne muscular dystrophy. *Growth hormone & IGF research*, 51:6–16.

Die Nummerierung der einzelnen Abschnitte in der nachfolgenden Veröffentlichung ist unabhängig von der Kapitelreihung in der vorliegenden Dissertationsschrift.



Contents lists available at ScienceDirect

Growth Hormone & IGF Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ghir

Linkage between growth retardation and pituitary cell morphology in a dystrophin-deficient pig model of Duchenne muscular dystrophy



I. Hofmann^a, E. Kemter^{b,c}, N. Theobalt^a, S. Fiedler^a, M. Bidlingmaier^d, A. Hinrichs^{b,c}, M. Aichler^e, K. Burkhardt^{b,c}, N. Klymiuk^{b,c}, E. Wolf^{b,c,f}, R. Wanke^a, A. Blutke^{e,*}

^a Institute of Veterinary Pathology at the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

^b Chair for Molecular Animal Breeding and Biotechnology, Gene Centre and Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

^c Centre for Innovative Medical Models (CiMM), Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleißheim, Germany

^d Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität München, Munich, Germany

^e Research Unit Analytical Pathology, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany

^f Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Centre, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Adenohypophysis
Disector
Growth hormone (GH)
Quantitative stereology
Short stature

ABSTRACT

Objective: Human patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD) commonly exhibit a short stature, but the pathogenesis of this growth retardation is not completely understood. Due to the suspected involvement of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 (GH/IGF1) system, controversial therapeutic approaches have been developed, including both GH- administration, as well as GH-inhibition. In the present study, we examined relevant histomorphological and ultrastructural features of adenohypophyseal GH-producing somatotroph cells in a porcine DMD model.

Methods: The numbers and volumes of immunohistochemically labelled somatotroph cells were determined in consecutive semi-thin sections of plastic resin embedded adenohypophyseal tissue samples using unbiased state-of-the-art quantitative stereological analysis methods.

Results: DMD pigs displayed a significant growth retardation, accounting for a 55% reduction of body weight, accompanied by a significant 50% reduction of the number of somatotroph cells, as compared to controls. However, the mean volumes of somatotroph cells and the volume of GH-granules per cell were not altered. Western blot analyses of the adenohypophyseal protein samples showed no differences in the relative adenohypophyseal GH-abundance between DMD pigs and controls.

Conclusion: The findings of this study do not provide evidence for involvement of somatotroph cells in the pathogenesis of growth retardation of DMD pigs. These results are in contrast with previous findings in other dystrophin-deficient animal models, such as the golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy, where increased mean somatotroph cell volumes and elevated volumes of intracellular GH-granules were reported and associated with DMD-related growth retardation. Possible reasons for the differences of somatotroph morphology observed in different DMD models are discussed.

1. Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe, heritable X-linked disease affecting one of ~3500 boys born [1]. The disease is caused by

mutations of the *DMD* gene (2.5 megabase pairs, 79 exons) encoding for dystrophin, a protein essential for the stabilization of muscular cell membranes. Loss of functional dystrophin in DMD results in a severe muscular wasting disease and premature death [2]. Children with DMD

Abbreviations: A, Area; A_A, Area density; ACID, Acidophil cells; AH, Adenohypophysis; BCA, Bicinchoninic acid protein assay; BMBF, Federal Ministry of Education and Research; BRW, Brain Weight; BW, Body Weight; DMD, Duchenne Muscular Dystrophy; FFPE, Formalin Fixed Paraffin Embedded; f_s, Linear tissue shrinkage factor; GH, Growth Hormone; GRMD, Golden Retriever Muscular Dystrophy; IGF1, Insulin-like Growth Factor 1; IUR, Isotropic Uniform Random; Mdx, dystrophin-deficient mice; N, Number; NH, Neurohypophysis; N_V, Numerical volume density; PG, Pituitary Gland; PGW, Pituitary Gland Weight; P.INTERM, Pars intermedia; Pt, Points; PT_{PT}, Point density; Q⁻, Counted particles; SOM, Somatotroph cells; 1SOM, Single somatotroph cell; SUR, Systematic Uniform Random; V, Volume; V_V, Volume density; WT, Wild Type

* Corresponding author at: Research Unit Analytical Pathology, Helmholtz Zentrum Muenchen, Ingolstaedter Landstrasse 1, 85764 Neuherberg, Germany.

E-mail address: andreas.parzefall@helmholtz-muenchen.de (A. Blutke).

<https://doi.org/10.1016/j.ghir.2019.12.006>

Received 10 September 2019; Received in revised form 16 December 2019; Accepted 30 December 2019

Available online 31 December 2019

1096-6374/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

commonly exhibit a short stature, and this growth retardation is regularly intensified by treatment with corticosteroids, which are often applied to decelerate the progress of increasing muscle weakness [3–8]. The pathogenesis of growth retardation in DMD patients and its potential effect on the course of the disease are still unclear [9,10]. Generally, increased metabolic activity due to permanent muscle necrosis and regeneration, as well as low levels of physical activity in DMD children likely contribute to a reduced growth rate [11–13]. A potential involvement of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 (GH/IGF1) system has been discussed as well [14–17], although there is no clear evidence for morphological alterations of the adenohypophysis indicating a derangement of the hypothalamic/pituitary GH/IGF1 system in human DMD patients. However, therapeutic approaches targeting the GH/IGF1 system in DMD patients are controversial. Clinical observations, as well as theoretical concerns indicated favorable disease courses in DMD patients with slower growth rates [18–20]. Therefore, different authors suggested GH-inhibition, e.g., by mazindol, as a potential treatment for DMD patients, to support a prolonged preservation of the ability to walk. However, these studies showed no significant improvement of muscle strength [21–23]. Conversely, other clinical trials attested beneficial effects of GH-administration in DMD patients, including improvement of cardiac function and prevention of adverse side effects of corticosteroid treatment, such as obesity and growth inhibition [24,25]. Using unbiased quantitative stereological analysis methods, De Lima et al. [16] demonstrated morphological alterations of GH-producing somatotroph cells in the pituitary gland of golden retriever dogs with muscular dystrophy (GRMD). The somatotroph cells of dystrophic dogs displayed significantly increased mean cell volumes and increased volumes of intracellular GH-containing secretory granules, while the total number of somatotrophs was not significantly altered as compared to control dogs. These findings provided evidence for a potential involvement of the GH/IGF1 system in the pathogenesis of growth retardation in the GRMD model [16].

In 2013 we reported generation and characterization of a genetically modified pig model of DMD that bears the same mutation of the *DMD* gene that most human patients carry. This tailored porcine DMD model mirrors the morphological hallmarks of the human disease more closely than murine or canine DMD models [26,27]. In the present study, state-of-the-art design based quantitative stereological methods were used to analyze the relevant morphological parameters of pituitary somatotroph cells in DMD pigs and controls. Except for a significant reduction in somatotroph cell numbers, DMD pigs did not exhibit morphological cellular alterations comparable to that reported in the GRMD model. These findings contribute new insights in the role of the GH/IGF1 system in different translational model systems of Duchenne muscular dystrophy.

2. Material and methods

2.1. Ethical statement

The present study examined pituitary tissue samples generated from genetically modified, dystrophin-deficient pigs and associated control animals that had been sacrificed in previous studies [26,27]. All experiments were carried out in accordance with the German Animal Welfare Act and were approved by the responsible animal welfare authority (District Government of Upper Bavaria, Reference Numbers 55.2–1-54-2531-86-10 and 55.2–1-54-2532-163-2014).

2.2. Samples

Pituitary tissue samples of 6 male dystrophin-deficient (DMD) pigs, aged 8 to 14 weeks, and of 5 age-matched, male wild type control (WT) pigs were examined. Pituitary glands were extracted after removal of the brain, as described previously [28]. After weighing of the pituitary,

a v-shaped sample of approximately 1 mm³ was excised from the adenohypophysis for molecular analyses, immediately frozen on dry ice, and stored at –80 °C until further investigation. The remaining pituitary tissue was processed for subsequent quantitative morphological analyses, as described below. In addition, serum samples from 4 DMD and 5 WT pigs, taken directly prior to euthanasia were analyzed.

2.3. Quantitative morphological analyses of the pituitary gland

2.3.1. Determination of the pituitary gland volume

The total volume of the pituitary gland ($V_{(PG)}$) was determined from the weight of the gland and the density of porcine pituitary gland tissue (Eq. 1), that was individually determined in each case. For this, the fresh pituitary gland was briefly dabbed with tissue paper to remove adjacent blood and tissue fluids and weighed to the nearest mg. The density of pituitary gland tissue (1.12 ± 0.03 g/cm³) was determined using the submersion method, exactly as described previously [28–32].

Equation 1. Volume of the pituitary gland.

$$V_{(PG)} = m_{(PG)} / \rho_{(PG)}$$

$V_{(PG)}$: Volume of the pituitary gland (PG). $m_{(PG)}$: Weight of the pituitary gland. $\rho_{(PG)}$: Density of the pituitary gland.

2.3.2. Systematic uniform random (SUR) sampling and sample processing

After excision of a sample of adenohypophyseal tissue for molecular analyses, the pituitary gland was fixed in neutrally buffered 4% formaldehyde solution for 36 to 48 h at room temperature with gentle agitation and subsequently transferred to 70% ethanol. For quantitative stereological analyses of somatotroph cell numbers, cell volumes, and secretory granule volumes, representative subsamples of the adenohypophysis (AH) (comprising approximately 10% of the total adenohypophysis volume) were generated by systematic uniform random (SUR) sampling as described earlier [28], and subsequently embedded in plastic resin. For SUR sampling, the fixed pituitary glands were embedded in agar (Carl Roth, Germany), to facilitate slicing and sectioned into parallel, equidistant slices of approximately 1 mm thickness, starting from a random point outside of the tissue. All slices were placed side by side in the same orientation (*i.e.*, the tissue slabs were consistently placed on either their right or their left side) and superimposed with a 4 mm cross grid printed on a plastic transparency. Tissue specimens were taken from every “ n^{th} ” location, where a cross of the grid hit adenohypophyseal tissue, with the first location being sampled randomly within the defined sampling interval (1- n). Sampled tissue locations were excised, using a biopsy punch of 2 mm diameter (Integra™ Miltex™, USA) and fixed with 6,25% glutaraldehyde in Soerensen's phosphate buffer (Serva, USA) for six hours. The SUR sampling is illustrated in detail in Fig. 1. On the average, 3 ± 1 subsamples of the adenohypophysis were generated per case. The 3D orientation of the samples (relative to the sectioning plane) was randomized, using the isector method, as described previously [28,32,33], and samples were subsequently embedded in epoxy resin (Epon, *aka* Glycid ether 100; Methyladic anhydride; 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol; 2-Dodecyl succinic acid anhydride (Serva, USA)).

For quantitative stereological analysis of the tissue composition of the pituitary gland, the remaining tissue slices were embedded in paraffin, maintaining the orientation of their section surfaces.

2.3.3. Determination of the volume of the adenohypophysis

According to the principle of Delesse [34], the volume fractions of the adenohypophysis in the pituitary glands ($V_{V(AH/PG)}$) were determined from the fractional areas of adenohypophyseal and pituitary tissue profiles in hematoxylin and eosin (HE)-stained sections of the paraffin embedded (FFPE) pituitary gland tissue slabs (Eq. 2). The respective section areas (A) were determined by point counting at 12.5× magnification, using a semiautomatic microscopy and stereology

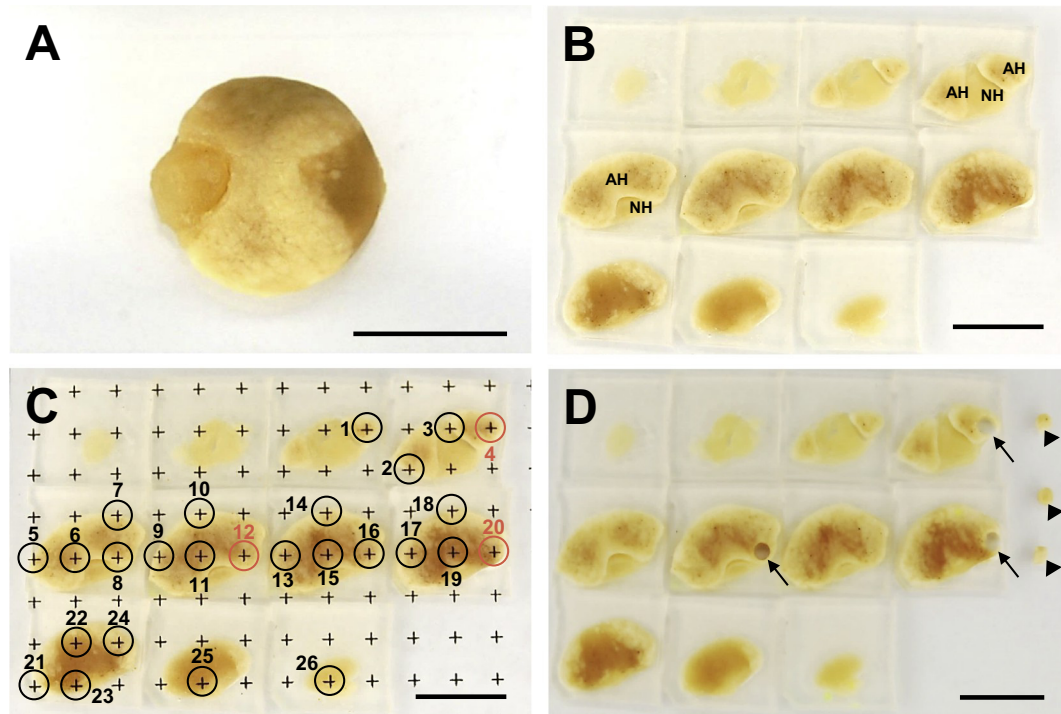


Fig. 1. Systematic uniform random (SUR) sampling of the adenohypophysis (*pars distalis*).

A, B The formalin-fixed pituitary gland (A) is embedded in agar and completely sectioned in parallel, equidistant tissue slabs of 1 mm thickness. The tissue slabs are placed on their right cutting surface (B). The section surfaces of the adenohypophysis (AH), and the neurohypophysis (NH, *pars nervosa*) can be identified. C: The tissue slabs are overlaid with a cross grid printed on a transparency. Crosses hitting the adenohypophysis (encircled in black) are counted (here: 26). This number is divided by the targeted number of samples to calculate the sampling interval (here: $26/3 = \sim 8$). Samples are systematically taken from the tissue locations corresponding to every eighth cross that hits the adenohypophysis (encircled in red), starting at a random position within the defined sampling interval (here: 4). D: Samples are excised, using a biopsy punch. Excision sites are indicated by arrows. The excised samples (arrowheads) are subsequently processed for plastic resin embedding (Epon, glycid ether) and electron microscopy. The remaining tissue slabs are embedded in paraffin. Bars = 1 cm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

system with newCAST™ software (Version 3.6.2.0, Visiopharm, Denmark), as principally described earlier [34–37]. On the average, 725 ± 299 points were counted per case.

Equation 2. Volume density of the adenohypophysis in the pituitary gland.

$$V_{V(AH/PG)} = A_{A(AH/PG)} = \frac{\sum A_{(AH)}}{\sum A_{(PG)}} = \frac{\sum Pt_{(AH)}}{\sum Pt_{(PG)}} = Pt_{Pt(AH/PG)}$$

$V_{V(AH/PG)}$: Volume density of the adenohypophysis (AH) in the pituitary gland (PG). $A_{A(AH/PG)}$: Area density of the adenohypophysis in the pituitary gland. $\Sigma A_{(AH)}/\Sigma A_{(PG)}$: Quotient of the cumulative section area of the adenohypophysis in all examined sections per case and the cumulative section area of the pituitary gland in the same sections. $\Sigma Pt_{(AH)}/\Sigma Pt_{(PG)}$: Quotient of the total number of points hitting section profiles of the adenohypophysis in all examined sections per case and the total number of points hitting the pituitary gland in the same sections. $Pt_{Pt(AH/PG)}$: Point density of the adenohypophysis in the pituitary gland.

The total volume of the adenohypophysis in the pituitary gland ($V_{(AH, PG)}$) was calculated (Eq. 3) from the volume density of the adenohypophysis in the pituitary gland ($V_{V(AH/PG)}$) and the total volume of the pituitary gland ($V_{(PG)}$), determined as described above and previously [31,34,35].

Equation 3. Total volume of the adenohypophysis in the pituitary gland.

$$V_{(AH, PG)} = V_{V(AH/PG)} \times V_{(PG)}$$

$V_{(AH, PG)}$: Total volume of the adenohypophysis (AH) in the pituitary gland (PG). $V_{V(AH/PG)}$: Volume density of the adenohypophysis in the

pituitary gland. $V_{(PG)}$: Volume of the pituitary gland.

2.3.4. Determination of the total volumes of acidophil and somatotroph cells in the adenohypophysis

The volume fractions of acidophil cells (ACID) (including lactotroph- and somatotroph cells) in the adenohypophysis ($V_{V(ACID/AH)}$), and the volume fraction of somatotroph cells (SOM) in the adenohypophysis ($V_{V(SOM/AH)}$) were determined by point counting analogous to the determination of the volume fraction of the adenohypophysis in the pituitary gland, using paraffin sections of the same pituitary tissue slices. The area density of section profiles of acidophil cells in the adenohypophysis was determined in 43 ± 5 systematic randomly sampled fields of view (at $200\times$ magnification) of HE stained paraffin sections (Fig. 2). Per case, 3413 ± 378 points were counted. For determination of the volume fraction of somatotroph cells in the adenohypophysis ($V_{V(SOM/AH)}$), somatotroph cell section profiles were identified by immunohistochemical detection of growth hormone (GH), using a specific polyclonal goat anti rat GH antibody (#AF1566 R&D systems, USA). The detailed immunohistochemistry protocol and the immunoreactivity pattern are provided in the supplementary data (Supplementary Protocol 1, Supplementary Fig. 1). The area density of section profiles of somatotrophs in the adenohypophysis was determined in 44 ± 4 systematically random sampled fields of view (at $200\times$ magnification), with 3406 ± 355 points counted per case. The total volumes of acidophil cells ($V_{(ACID, AH)}$) and of somatotroph cells ($V_{(SOM, AH)}$) in the adenohypophysis were calculated from their volume fractions and the total adenohypophysis volume ($V_{(AH, PG)}$).

2.3.5. Determination of the number and the mean cell volume of somatotroph cells in the adenohypophysis

The total number of somatotroph cells was estimated by physical disector analysis, using isotropic uniform random (IUR) serial semithin section pairs of epoxy resin embedded adenohypophyseal tissue samples. Serial semithin sections with a nominal thickness of 0.5 μm were cut on a Ultracut OmU-4 microtome (Reichert Jung, Austria). The true section thickness was controlled *via* spectral reflectance measurement (F20 Filmetrics®, USA) as described previously [38] and accounted for $0.48 \pm 0.01 \mu\text{m}$. For unambiguous identification of somatotroph cells in sections of epoxy resin embedded tissue (Fig. 2), an immunohistochemical protocol was developed, using a specific polyclonal goat anti rat GH antibody (#AF1566 R&D systems, USA). The detailed immunohistochemistry protocol and the immunoreactivity pattern are provided in the supplementary data (Supplementary Protocol 1,

Supplementary Fig. 2). The numerical density of somatotroph cells in the adenohypophysis ($N_{V(SOM/AH)}$) was estimated, applying the physical disector method [31,34,38,39] in combination with systematic point counting, as principally described in previous publications of our group [31,36]. Pairs of semithin sections with a distance of $\sim 1 \mu\text{m}$ were randomly sampled from a series of ≥ 9 consecutive sections, prepared from each adenohypophyseal tissue block (3 ± 1) per case. One section served as “reference section”, the second section as “look-up” section. Both sections were digitally aligned. In each section pair, corresponding section areas were systematically randomly sampled at $200\times$ magnification (30 ± 4 areas per case). Unbiased counting frames of $24,180 \mu\text{m}^2$ were digitally superimposed on the digital images of the corresponding section areas in the reference- and the look-up section. The distance between the two IUR sections, *i.e.*, the disector height, and the area of the unbiased counting frames define a three-

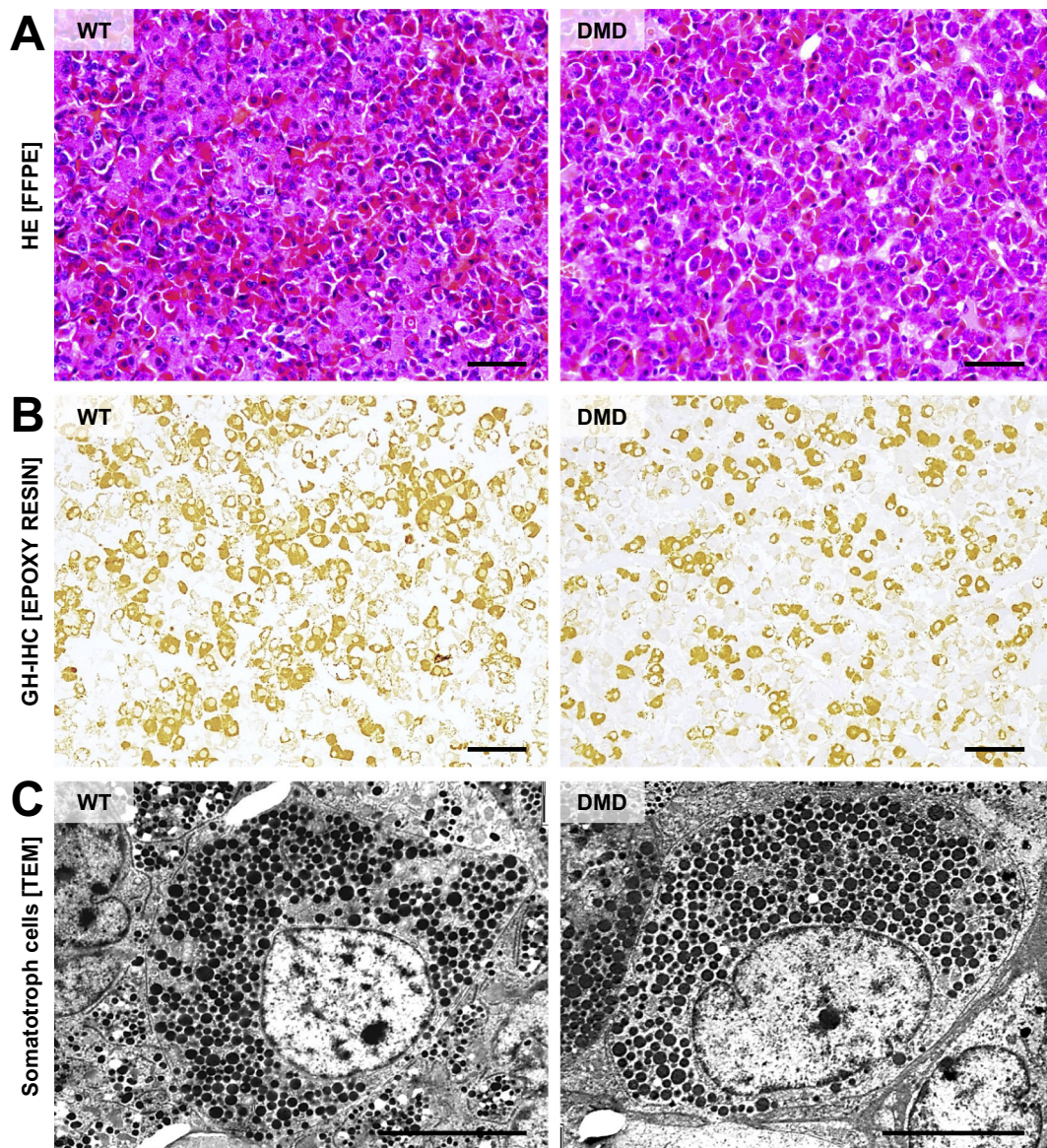


Fig. 2. Histology, immunohistochemical identification, and ultrastructure of somatotroph cells in the adenohypophysis of WT- and DMD-pigs. A: In HE-stained paraffin sections of the adenohypophysis, different types of (red-stained) acidophil cells (such as somatotroph cells and lactotroph cells) cannot reliably be differentiated. Bars = 50 μm . B: Identification of somatotroph cells in semithin sections of epoxy resin embedded adenohypophyseal tissue by immunohistochemical detection (IHC) of growth hormone (GH). Somatotroph cells display a densely granular cytoplasmic immunoreactivity pattern (brown color). The numerical area density of somatotroph cell profiles in sections of the adenophypophysis of DMD pigs is clearly reduced, as compared to WT pigs. Bars = 50 μm . C: Transmission electron microscopic (TEM) images of somatotroph cells of WT- and DMD-pigs with characteristic electron-dense GH-granules. Bars = 5 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

dimensional test volume (disector volume), that is used to count and size particles independent of their size, shape, and orientation [39]. The average true physical disector height of $0.95 \pm 0.02 \mu\text{m}$ was determined by spectral reflectance measurement of the individual thicknesses of the examined semithin sections as described above. The section areas of adenohypophyseal tissue, as well as of somatotroph cell section profiles within the unbiased counting frame areas in the reference sections were determined by point counting (721 ± 113 points per case). Nuclear cross section profiles of (GH-positive) somatotroph cells present in the test field defined by the unbiased counting frame in the reference section and absent in the look-up section were counted (Q^-). On the average, $87 \pm 11 Q^-$ were counted per case. An exemplary illustration of the disector principle for counting of somatotroph cells is provided in Supplementary Fig. 3. The numerical density of somatotroph cells in the adenohypophysis ($N_{V(SOM/AH)}$) was calculated from the cumulative number of counted somatotroph cell nuclei in all analyzed disectors per case, and corrected for the extent of tissue shrinkage related to the embedding in epoxy resin (f_s) [40] (Eq. 4). The total number of somatotroph cells in the adenohypophysis ($N_{(SOM, AH)}$) was then calculated by multiplication of the numerical volume density of somatotroph cells in the adenohypophysis and the total volume of the adenohypophysis ($V_{(AH, PG)}$) [31,34].

Equation 4. Numerical volume density of somatotroph cells in the adenohypophysis.

$$N_{V(SOM/AH)} = \sum Q^- / (h \times \sum A_{(AH)}) \times f_s^3$$

$N_{V(SOM/AH)}$: Numerical volume density of somatotroph cells (SOM) in the adenohypophysis (AH). $\sum Q^-$: Cumulative number of somatotroph nuclei counted in all disectors per case. h : Disector height ($0.95 \pm 0.02 \mu\text{m}$). $\sum A_{(AH)}$: Cumulative section area of the adenohypophysis in all examined disectors per case. f_s : Linear tissue shrinkage factor for epoxy resin embedded tissue (0.95).

The volume density of somatotroph cells in the adenohypophysis ($V_{V(SOM/AH)}$) was determined from the area fraction of somatotroph cell profiles and the section area of the adenohypophysis in the examined disector section pairs, as described above.

The volume densities of somatotroph cells in the adenohypophysis ($V_{V(SOM/AH)}$) determined in paraffin sections and in sections of plastic-resin embedded adenohypophyseal tissue samples did not differ significantly, thus confirming the representativity of the tissue locations sampled for the disector analysis.

The mean volume of somatotroph cells ($\bar{V}_{(SOM, AH)}$) was then calculated from the volume density ($V_{V(SOM/AH)}$), and the numerical volume density of somatotroph cells in the adenohypophysis ($N_{V(SOM/AH)}$) [31,34,37] (Eq. 5).

Equation 5. Mean somatotroph cell volume.

$$\bar{V}_{(SOM, AH)} = V_{V(SOM/AH)} / N_{V(SOM/AH)}$$

$\bar{V}_{(SOM, AH)}$: Mean volume of somatotroph cells (SOM) in the adenohypophysis (AH). $V_{V(SOM/AH)}$: Volume density of somatotroph cells in the adenohypophysis. $N_{V(SOM/AH)}$: Numerical volume density of somatotroph cells in the adenohypophysis.

2.3.6. Determination of the total volume of growth hormone (GH)-granules and the total volume of GH-granules per somatotroph cell

Using transmission electron microscopy, the total volume of GH-granules (GH-GRAN) in the somatotroph cells of the adenohypophysis, as well as the total volume of GH-granules per single somatotroph cell ($V_{(GH-GRAN, 1 SOM)}$) were determined in ultrathin IUR sections of epoxy resin embedded tissue samples of the adenohypophysis (3 ± 1 samples per case). Ultrathin sections of approximately 70 nm were mounted on copper grids (G2450C, Plano, Wetzlar), contrasted with 0.5% uranyl acetate (Science Services GmbH, Germany) and 3% lead citrate (UltraStain II Leica, Wetzlar, Germany), according to standard protocols, and examined with an EM10 transmission electron microscope

(Zeiss, Germany). The volume fractions of GH-granules in somatotroph cells ($V_{V(GH-GRAN/SOM)}$) were determined by point counting in 34 ± 5 systematically randomly sampled section areas of adenohypophyseal tissue per case at $4000 \times$ magnification, principally as described above. Somatotroph cells (Fig. 2) were identified by their morphology and the size of their GH-granules [41–43]. Per case, 1731 ± 273 points were counted. The total volume of GH-granules ($V_{(GH-GRAN, SOM)}$) was calculated by multiplication of the volume fraction of GH-granules in the somatotroph cells ($V_{V(GH-GRAN/SOM)}$) by the total volume of somatotroph cells in the adenohypophysis ($V_{(SOM, AH)}$). The total volume of GH-granules per single somatotroph cell ($V_{(GH-GRAN, 1SOM)}$) was calculated (Eq. 6) by multiplication of the volume density of GH-granules in the somatotroph cells ($V_{V(GH-GRAN/SOM)}$) and the mean somatotroph cell volume in the adenohypophysis ($\bar{V}_{(SOM, AH)}$).

Equation 6. Total volume of GH-granules per single somatotroph cell.

$$V_{(GH-GRAN, 1SOM)} = V_{V(GH-GRAN/SOM)} \times \bar{V}_{(SOM, AH)}$$

$V_{(GH-GRAN, 1SOM)}$: Total volume of GH-granules (GH-GRAN) per single somatotroph cell (1SOM). $V_{V(GH-GRAN/SOM)}$: Volume density of GH-granules in the somatotroph cells. $\bar{V}_{(SOM, AH)}$: Mean somatotroph cell volume in the adenohypophysis.

2.4. Immunoblot analysis of the adenohypophyseal GH-abundance

Quantitative detection of GH in the adenohypophysis was performed by Western blot analysis. Adenohypophyseal tissue samples from 5 DMD- and 5 WT-pigs were collected as described above and homogenized with a disperser (ART-Micra D-8, MICCRA, Germany) in Laemmli extraction buffer (1 M Tris pH 6.8; 100% glycerol; 0.5 M EDTA pH 8.0, SDS, bromophenol blue, protease inhibitor (cOmplete Tablets, mini; Roche, Germany)). Protein concentrations were determined, using a bicinchoninic acid protein assay (BCA) [44] and measured with the Tecan Sunrise™ absorbance microplate reader (Tecan, Switzerland). Afterwards, 1 μg of total adenohypophysis protein per animal and 1 μg of recombinant porcine GH (16,343,666, ImmunoTools, Germany) were loaded on a 10% SDS-page gel and subjected to electrophoresis at 130 V for 60 min. Separated proteins were transferred to Immobilon-P membranes (Milipore, Germany) at 100 V for 30 min using the Trans-Blot Turbo, Transfer System (Bio-Rad, USA). Membranes were stained using ponceau red as described previously [44,45]. GH bands (22 kDa) were detected using 1:20000 diluted goat anti rat GH antibody (#AF1566, R & D systems, USA). Additionally, GAPDH was detected after membrane stripping as an internal reference, using a 1:2000 diluted rabbit anti GAPDH antibody (#2118, Cell Signaling, USA). The detailed immunoblot protocol including all primary and secondary antibodies and their dilutions is provided in the supplementary data (Supplementary Protocol 2). Bound antibodies were visualized using ECL reagent (Amersham™, GE Healthcare, UK) and an ECL Chemostar fluorescence imager (Intas, Germany). Band intensities were quantified by densitometry, using Image J software (Image J, Version 1.52a, USA). For comparison of the relative adenohypophyseal GH-abundances of DMD- and WT-pigs, the GH-band intensities were normalized to the intensities of GAPDH-bands, detected in the identical samples.

2.5. Determination of GH- and IGF1- serum concentrations

Serum concentrations of GH and IGF1 were determined in serum samples of 4 DMD- and 5 WT-pigs. GH-serum levels were measured, using a commercially available ELISA for rat/mouse GH (ERZMRGH-45 K, Merck, Germany), as described previously [46]. IGF1 concentrations were measured using the iSYS automated chemiluminescent IGF1 assay (Immunodiagnostic Systems, IDS, UK) as described previously [47]. The assay includes two monoclonal antibodies and is calibrated against the WHO International Standard 02/254 (National

Institute for Biological Standards, NIBSC, United Kingdom). Although the assay is intended for measurement of human IGF1, the high homology between human and porcine IGF1 also allows for quantification of IGF1 in porcine serum samples [47].

3. Statistical analyses

Data were analyzed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA). If not stated otherwise, data are shown as means \pm standard deviations (SD). Kolmogorov-Smirnov normality tests, simple linear regression analyses, unpaired Student's *t*-tests or Mann-Whitney *U* test were performed, as indicated. *P*-values of $p < .05$ were considered statistically significant.

4. Results

4.1. DMD pigs display reduced body weights and decreased pituitary volumes

As reported previously [26], DMD pigs displayed a significant growth retardation, accounting for a 55% reduction of body weight compared to WT pigs. Brain weights were significantly reduced by 21% in DMD- vs. WT-pigs, as well ($p = .02$). In contrast, the relative brain weights of DMD pigs were nearly twice as high as in WT pigs. Compared to WT controls, the absolute volumes of the pituitary glands of DMD pigs were significantly diminished by $\sim 35\%$, whereas their relative pituitary gland weights and volumes (related to body weight) were significantly higher than in WT control pigs ($p = .02$ respectively $p = .02$). When related to the brain weight, the pituitary gland weights and volumes were not significantly different ($p = .07$ respectively $p = .07$) in WT- and DMD-pigs (Table 1).

4.2. The total adenohypophyseal volume is decreased in DMD pigs

WT- and DMD-pigs demonstrated similar volume densities of the adenohypophysis in the pituitary gland, accounting for approximately 70% of the volume of the pituitary gland. The total volumes of the adenohypophysis in DMD pigs were approximately one third lower ($p = .05$) than in WT pigs (Table 2, Fig. 3).

4.3. DMD pigs display significantly reduced total volumes and numbers of somatotroph cells

Within sections of the adenohypophysis of both WT- and DMD-pigs, acidophil- and somatotroph cells, respectively, displayed a typical unequal distribution pattern [48], occasionally forming clusters arranged

Table 1
Body, brain and pituitary gland-weights.

Parameter	WT	DMD
Body weight (kg)	43.6 \pm 9.7	19.6 \pm 8.0**
Brain weight (g)	91.6 \pm 9.0	72.3 \pm 11.7*
Pituitary gland weight (mg)	188 \pm 36	121 \pm 41*
Relative brain weight (% of body weight)	0.22 \pm 0.04*	0.43 \pm 0.14
Relative pituitary gland weight (% of body weight $\times 10^{-3}$)	0.44 \pm 0.04	0.66 \pm 0.15*
Relative pituitary gland weight (% of brain weight)	0.2 \pm 0.03	0.16 \pm 0.03
Relative pituitary gland volume (mm ³ per kg body weight)	3.96 \pm 0.36	5.96 \pm 1.33*
Relative pituitary gland volume (mm ³ per g brain weight)	2.03 \pm 0.26	1.62 \pm 0.33

Data are means \pm standard deviations. Statistically significant differences between WT- and DMD-pigs are marked by asterisks.

* $p < .05$.

** $p < .01$.

Table 2

Quantitative stereological data of the pituitary gland and of somatotroph cells in WT- and DMD- pigs.

Parameter	WT	DMD
$V_{V(AH/PG)}$	0.71 \pm 0.03	0.72 \pm 0.04
$V_{V(P.INTERM/PG)}$	0.09 \pm 0.03	0.04 \pm 0.01**
$V_{(P.INTERM, PG)}$ (mm ³)	15.8 \pm 6.2	4.8 \pm 2.3**
$V_{V(NH/PG)}$	0.19 \pm 0.03	0.24 \pm 0.05
$V_{(NH, PG)}$ (mm ³)	32.5 \pm 3.2	24.6 \pm 4.9*
$V_{V(ACID/AH)}$	0.27 \pm 0.02	0.23 \pm 0.03*
$V_{(ACID, AH)}$ (mm ³)	33.2 \pm 8.1	18.1 \pm 6.7*
$V_{V(SOM/AH)}$	0.25 \pm 0.01	0.20 \pm 0.02**
$N_{V(SOM/AH)}$ (n/10 ⁵ µm ³)	13.2 \pm 3.8	9.9 \pm 0.8
$V_{V(GH-GRAN/SOM)}$	0.26 \pm 0.01	0.26 \pm 0.03
$V_{(GH-GRAN, SOM)}$ (mm ³)	7.9 \pm 1.8	4.0 \pm 1.3**
$N_{(SOM, AH)/V_{(PG)}}$ (N/mm ³)	93685 \pm 25916	71473 \pm 8399
$N_{(SOM, AH)/V_{(AH, PG)}}$ (N/mm ³)	132057 \pm 38213	99120 \pm 8068
$N_{(SOM, AH)/PG}$ (N/mg)	85168 \pm 23560	64975 \pm 7635
$N_{(SOM, AH)/BRW}$ (N/g)	177820 \pm 68296	106925 \pm 30883
$N_{(SOM, AH)/BW}$ (N/kg)	370983 \pm 108183	422457 \pm 84727

Data are means \pm standard deviations. Statistically significant differences between WT- and DMD-pigs are marked by asterisks.

V = Volume, V_v = Volume density, N_v = Numerical volume density, AH = Adenohypophysis, P.INTERM = Pars intermedia, NH = Neurohypophysis, ACID = Acidophil cells, SOM = Somatotroph cells, GH-GRAN = GH-granules, N = Number, PG = Pituitary gland, PGW = Pituitary gland weight, BRW = Brain weight, BW = Body weight.

* $p < .05$.

** $p < .01$.

along blood vessels and in the periphery of the adenohypophysis. The volume density of acidophil cells in the adenohypophysis was slightly, but significantly reduced in DMD pigs, as compared to WT pigs ($p = .03$). The total volume of acidophil cells in the adenohypophysis of DMD pigs was significantly 45% lower than in WT pigs. Both, the volume densities and the total volumes of somatotroph cells in the adenohypophysis of DMD pigs were significantly smaller than in WT controls (Table 2, Fig. 3). The numerical volume densities of somatotroph cells in the adenohypophysis of DMD- vs. WT-pigs were decreased, but not significantly different, whereas the total number of somatotroph cells was significantly reduced by half in DMD- vs. WT-pigs (Table 2, Fig. 3).

4.4. Somatotroph cells of DMD- and WT- pigs do not differ in size or in the volume of GH-granules

DMD pigs and WT controls displayed comparable mean cell volumes of somatotroph cells (Table 2, Fig. 3). Electron microscopic analyses revealed no evidence for morphological alterations of the subcellular ultrastructure of somatotroph cells in DMD pigs. WT- and DMD- somatotroph cells contained regular, electron dense, round cytoplasmic GH-granules of 300–500 nm in diameter (Fig. 2). As verified by quantitative stereological analyses, neither the volume densities, nor the total volumes of GH-granules per single somatotroph cell were significantly different in WT- and DMD-pigs (Table 2, Fig. 3).

4.5. Pituitary weight and somatotroph cell number are correlated with body- and brain weight in WT- and DMD-pigs

In WT- and DMD-pigs, the weight of the pituitary gland and the number of somatotroph cells showed a significant positive correlation with body weight and brain weight. The somatotroph cell number also correlated significantly with the total volume of the pituitary gland and of the adenohypophysis, respectively, in both DMD- and WT-pigs (Fig. 4). In addition, there was no significant difference in the number of somatotroph cells in the adenohypophysis ($N_{(SOM, AH)}$) between DMD- and WT-pigs in relation to their pituitary gland volumes ($V_{(PG)}$) as well

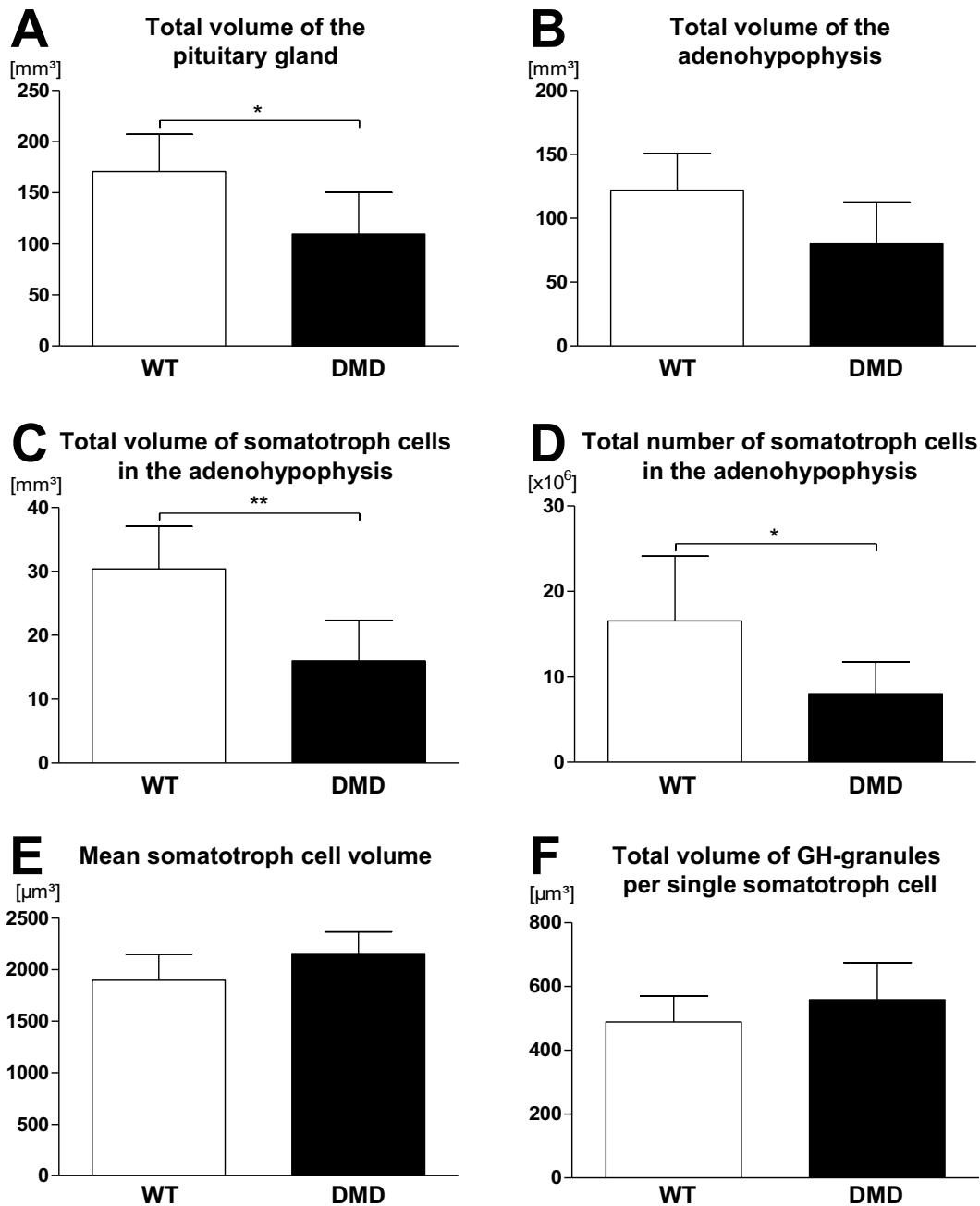


Fig. 3. Quantitative stereological analysis of the pituitary gland of WT- and DMD-pigs.

A: The total volume of the pituitary gland is significantly decreased in DMD- vs. WT-pigs. B: Total volume of the adenohypophysis. C, D: The total volume and the number of somatotroph cells in the adenohypophysis is significantly reduced in DMD pigs, as compared to WT pigs. E, F: The mean volume of somatotroph cells, as well as the total volume of growth hormone (GH)-granules per single somatotroph cell are not significantly different in WT-and DMD-pigs. Significant differences (Student's *t*-test) are indicated by asterisks. **p* < .05; ***p* < .01.

as to their volumes of the adenohypophysis ($V_{(AH,PG)}$), or their pituitary gland weights (PGW), their brain weights (BRW) respectively their body weights (BW) as shown in Table 2.

4.6. The relative GH-content in the adenohypophysis is not altered in DMD pigs

Western blot analysis of the relative GH-content of adenohypophyseal tissue samples revealed similar intensities of GH bands at 22 kDa (normalized to GAPDH protein abundance) within DMD- and WT-pigs (Fig. 5).

4.7. GH- and IGF1-serum concentrations are not significantly altered in DMD pigs

Analysis of serum concentrations of growth hormone (GH) and Insulin-like growth factor 1 (IGF1) in serum samples taken at a single time point revealed no significant differences between DMD- and WT-pigs. The GH-serum levels displayed a high variation, ranging from 0.07 to 0.64 ng/ml in WT pigs (mean GH-level: 0.47 ± 0.22 ng/ml) and from 0.08 to 4.83 ng/ml in DMD pigs (mean GH-level: 2.27 ± 2.14 ng/ml) (*p* = .1, Mann-Whitney U Test). Although DMD pigs showed a tendency towards lower IGF1 serum concentrations (127.0 ± 70 ng/ml), as compared to WT controls (283 ± 112 ng/ml), these differences

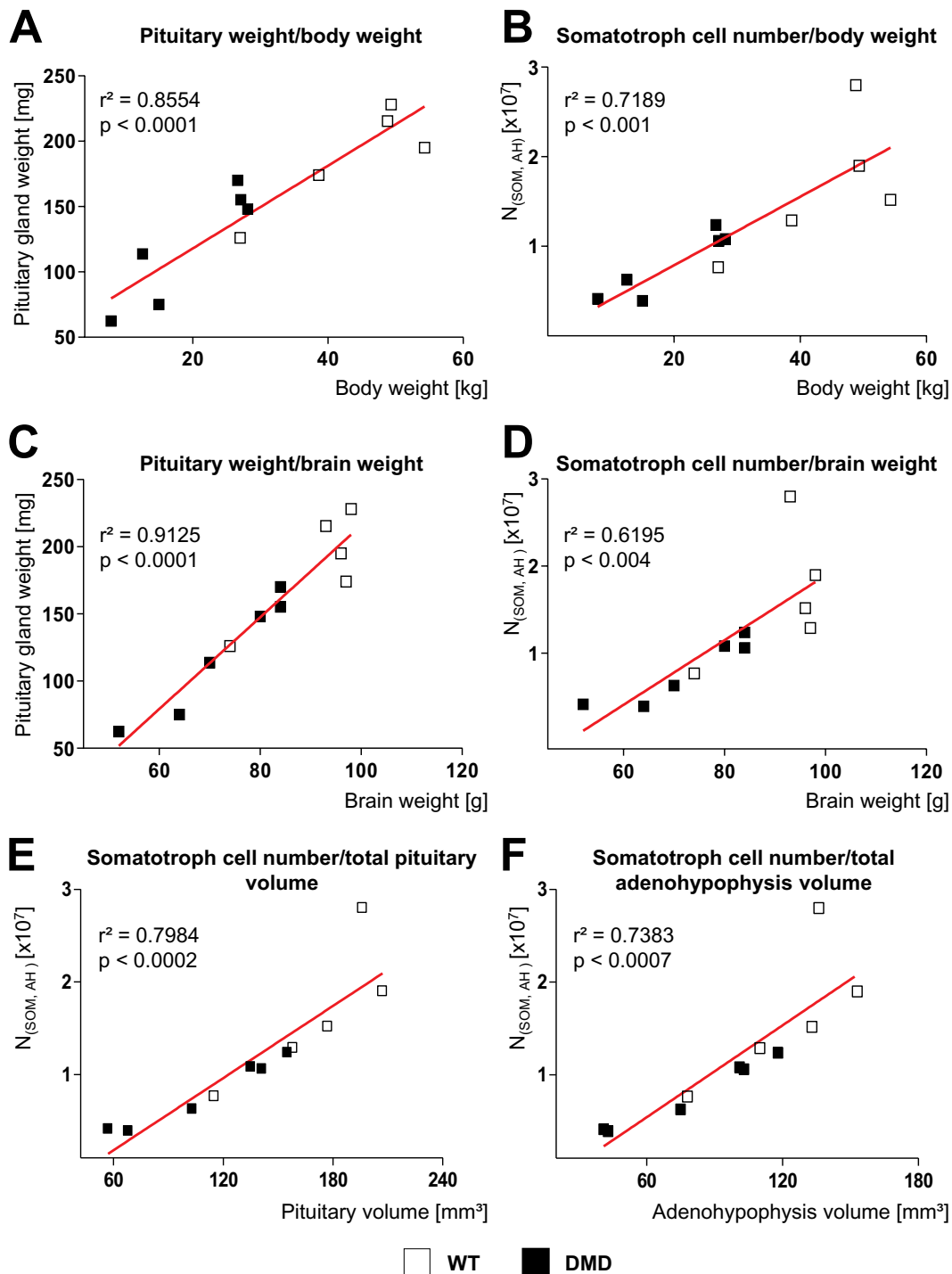


Fig. 4. Correlation of pituitary weight and the number of somatotrophs per body weight or brain weight in WT- and DMD-pigs.

In WT- and DMD-pigs, the weight of the pituitary gland and the number of somatotroph cells in the adenohypophysis shows a significant correlation with body weight (A, B) and brain weight (C, D), respectively. The number of somatotroph cells also displays a significant correlation with the total volume of the pituitary gland (E) and the total volume of the adenohypophysis (F) in WT- and DMD-pigs (Pearson test).

did not reach the level of statistical significance ($p = .064$, Mann-Whitney U Test).

5. Discussion

Different experimental animal models of DMD have been established to study the pathogenesis of the disease, and to develop and test effective treatment strategies [49–56]. However, different DMD animal

models often display considerable variations regarding the reproducible development, and the extent of DMD associated clinical symptoms and lesion patterns that are observed in human patients [56].

Established DMD animal models include genetically modified rodent models, such as mice, rats, and small mammals like rabbits [57–59], genetically modified large animal models, such as DMD pigs [26] as well as models of spontaneous DMD development, like the golden retriever muscular dystrophy (GRMD) model [60]. Murine

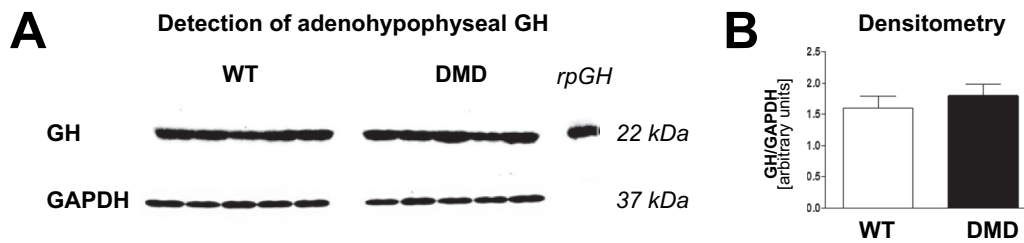


Fig. 5. Western blot analysis of the GH-abundance in the adenohypophysis.

A: GH (22 kDa) and GAPDH (37 kDa) bands of male control ($n = 5$) and DMD ($n = 5$) pigs of three months of age. Recombinant porcine GH (rpGH) served as a positive control. B: Densitometric analysis of band intensities (normalized to GAPDH) shows no significant difference between WT- and DMD- pigs ($p = .13$).

models of DMD, such as the mdx mouse [61,62] or the mdx52 mouse [63], often display only a mild clinical phenotype and histopathological skeletal muscle alterations [56,59], while growth retardation is commonly not present in mdx mice [64]. GRMD dogs may develop fulminant clinical symptoms, but the phenotype varies substantially between individual dogs [65]. A newer canine DMD model (delta E50-MD), bred on a beagle genetic background, exhibits a more consistent phenotype and histopathological lesion patterns [66]. DMD pigs represent the first tailored, genetically modified large animal DMD model. DMD pigs carry the same mutation in the *DMD* gene that is most frequently observed in human DMD patients [26] and reproducibly develop clinical and pathomorphological alterations closely resembling the human disease. The morphological, functional, and molecular alterations in the porcine DMD model have thoroughly been characterized, providing new functional insights into the derangements of dystrophic muscles on the transcriptome and proteome level [26,27]. The model is regarded as a most valuable test system for the development of molecular treatment strategies of DMD, such as exon skipping therapy [67]. Due to their exhaustive characterization, DMD pigs also represent a highly useful model system to examine diverse aspects of the human disease that cannot be adequately studied in human sample materials, such as morphological alterations of pituitary somatotroph cells of DMD patients with impaired body growth.

In the present study we applied refined, unbiased quantitative stereological and molecular analysis methods to unambiguously characterize the relevant morphological and functional parameters of growth hormone secreting cells of the pituitary gland in DMD pigs. The results provide no evidence for alterations of the cellular or ultrastructural morphology, or the GH-content of adenohypophyseal somatotrophs in DMD pigs, that would support a causative involvement of pituitary GH-production or release in the pathogenesis of DMD-related growth retardation in DMD pigs.

Somatotroph cells in DMD pigs displayed a regular histomorphology and ultrastructure, along with unchanged mean cell volumes and volumes of intracellular GH-granules, indicating unimpaired somatotroph GH-synthesis, storage and secretion. Immunoblot analysis did also not show evidence for an altered GH-content of somatotroph cells in the adenohypophysis, and the IGF1-serum levels of DMD pigs were not significantly reduced. The high deviation of GH-concentrations observed in DMD- and WT- serum samples taken at a single time point is in line with a pulsatile secretion pattern of GH from the pituitary gland [46,68]. Merely the absolute number of somatotroph cells was significantly reduced in DMD pigs. However, this finding alone does not indicate pituitary malfunction, since the reduction of somatotroph cell numbers in DMD pigs was accompanied by reduced pituitary and adenohypophyseal volumes and drastically decreased body weights. As the number of somatotroph cells displayed a significant positive correlation with body- and brain- weights, as well as with the volumes of the pituitary gland and the adenohypophyseal volumes, respectively, in both DMD- and WT-pigs, the reduced absolute numbers of somatotroph cells in DMD pigs are not likely to reflect a disturbed GH-production or secretion. Moreover, decreased somatotroph cell numbers have also been observed occurring after repeated immobilisation and restraint in

rats [69]. DMD pigs in advanced stages of muscular dystrophy display a limited ability to move [26], which might therefore also contribute to the reduction of somatotroph cells.

On the one hand, the results of the present study contribute to the comprehensive characterization of DMD pigs, and thus strengthen the translational value of the model. On the other hand, our findings are in contrast to results of quantitative stereological analysis in the canine GRMD model. De Lima et al. (2007) [16] were able to demonstrate a hypertrophic growth of somatotroph cells in GRMD dogs, accompanied by increased volumes of GH-granules per cell. The authors interpreted this finding as a potential consequence of an impaired dystrophin-dependent GH-secretion from somatotroph cells [16].

Matsumoto et al. [5] also assumed an important role of dystrophin in growth regulation, because patients with a mutation in dystrophin isoform DP71 are more likely affected by short stature. However, hypertrophy of somatotroph cells as a result of reduced GH-secretion could not be experimentally confirmed in a study where GH-secretion from somatotroph cells was inhibited with a botulinum neurotoxin derived targeted secretion inhibitor in rats [70].

What are the possible explanations for the different morphological alterations of somatotrophs observed in DMD pigs and the GRMD model? Of course, the different results could simply reflect species-specific differences of somatotroph pathophysiology and function in states of progressive muscular dystrophy. Furthermore, also technical/methodological differences between the study of De Lima et al. [16] and the present study might have to be taken into account. Both studies applied design based quantitative stereological methods for counting and sizing of somatotroph cells, such as the physical disector technique in plastic resin embedded tissue sections. This analysis technique is regarded as the gold-standard for unbiased estimation of cell numbers and mean cellular volumes [31,34,71,72]. Plastic resin embedding of tissue samples for physical disector analyses is advantageous, since it allows for sectioning of consistently thin sections with plane section surfaces, which is an important prerequisite for counting of cell nuclei with the physical disector method [38]. Additionally, plastic embedded tissue samples display a less significant and, even more important, a reproducible extent of embedding-related tissue shrinkage [38,71,73], as compared to paraffin-embedding. However, immunohistochemical identification of specific cell types is often not feasible in sections of plastic resin embedded tissue samples. On the level of light microscopy, a reliable differentiation of somatotroph cells from other cell types in the adenohypophysis that also display an acidophilic staining behaviour in standard HE sections, usually requires immunohistochemistry for detection of GH. In their study, De Lima et al. identified somatotrophs immunohistochemically in frozen sections prepared from one half of the adenohypophysis. They used the pattern of immunohistochemically GH-positive cell section profiles in the frozen sections to locate somatotroph cells in plastic sections prepared from tissue samples of the second half of the gland and used these for the disector analyses. In the present study, an immunohistochemical protocol was developed, allowing for detection of GH in semithin sections of plastic resin embedded porcine pituitary gland tissue. This enabled us to perform physical disector analyses for unbiased estimation of the

numerical volume densities of unambiguously identified somatotroph cells in semithin Epon-sections of the porcine adenohypophysis.

The present study did not provide any evidence for morphological or functional alterations of GH-producing cells in the pituitary gland. Nevertheless, the GH/IGF1 system may yet essentially be involved in the pathogenesis of reduced body growth rates in both DMD pigs and human patients, since muscle fiber degeneration, necrosis and inflammatory processes could impair local GH/IGF1-actions at the (dystrophic) skeletal musculature, e.g., by induction of a GH-resistance [74], or simply by reduction of muscle fibres with intact membrane-expression of GH- and IGF1- receptors.

6. Conclusion

In contrast to the canine GRMD model of DMD, the growth retardation observed in DMD pigs is not related to marked alterations of the cellular or ultrastructural morphology of adenohypophyseal somatotroph cells. Therefore, pituitary GH-production or release does not appear to be a major contributor to the impaired physical development of DMD pigs. So far, there are no comparable quantitative stereological investigations of the pituitary gland in human DMD patients. Therefore, further studies are necessary to clarify the relevance of somatotroph cell function in the pathogenesis of growth retardation in human DMD.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2019.12.006>.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

The authors thank Lisa Pichl, Marold Handl, Josef Grieser, Clara Kauffhold, Claudia Mair, Heidrun Schöl, Gabriele Mettenleiter and Tatiana Schröter for excellent technical assistance.

Funding

Isabel Hofmann, Natalie Theobalt, and Sonja Fiedler received a PhD scholarship from the Hanns-Seidel-Stiftung e.V. using funds of The Federal Ministry of Education and Research (BMBF).


References


- [1] A.E. Emery, Population frequencies of inherited neuromuscular diseases—a world survey, *Neuromuscul. Disord.* 1 (1991) 19–29.
- [2] E.P. Hoffman, R.H. Brown, L.M. Kunkel JR, Dystrophin: the protein product of the duchenne muscular dystrophy locus, *Cell* 51 (1987) 919–928.
- [3] U. Eiholzer, E. Boltshauser, D. Frey, L. Molinari, M. Zachmann, Short stature: a common feature in duchenne muscular dystrophy, *Eur. J. Pediatr.* 147 (1988) 602–605.
- [4] E. Sarrazin, M. von der Hagen, U. Schara, K. von Au, A.M. Kaindl, Growth and psychomotor development of patients with duchenne muscular dystrophy, *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 18 (2014) 38–44, <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2013.08.008>.
- [5] M. Matsumoto, H. Awano, T. Lee, Y. Takeshima, M. Matsuo, K. Iijima, Patients with duchenne muscular dystrophy are significantly shorter than those with becker muscular dystrophy, with the higher incidence of short stature in Dp71 mutated subgroup, *Neuromuscul. Disord.* 27 (2017) 1023–1028, <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.06.007>.
- [6] D.R. Weber, S. Hadjiyannakis, H.J. McMillan, G. Noritz, L.M. Ward, Obesity and endocrine management of the patient with duchenne muscular dystrophy, *Pediatrics* 142 (2018) S43–s52, <https://doi.org/10.1542/peds.2018-0333F>.
- [7] L. Merlini, M. Gennari, E. Malaspina, et al., Early corticosteroid treatment in 4 duchenne muscular dystrophy patients: 14-year follow-up, *Muscle Nerve* 45 (2012) 796–802, <https://doi.org/10.1002/mus.23272>.
- [8] R.C. Griggs, J.P. Miller, C.R. Greenberg, et al., Efficacy and safety of deflazacort vs prednisone and placebo for duchenne muscular dystrophy, *Neurol.* 87 (2016) 2123–2131, <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000003217>.
- [9] B.H. Nagel, W. Mortier, M. Elmlinger, H.A. Wollmann, K. Schmitt, M.B. Ranke, Short stature in duchenne muscular dystrophy: a study of 34 patients, *Acta Paediatr.* 88 (1999) 62–65.
- [10] C.L. Wood, V. Straub, M. Guglieri, K. Bushby, T. Cheetham, Short stature and pubertal delay in duchenne muscular dystrophy, *Arch. Dis. Child.* 101 (2016) 101–106, <https://doi.org/10.1136/archdischild-2015-308654>.
- [11] B.A. Valentine, B.J. Cooper, J.F. Cummings, A. de Lahunta, Canine X-linked muscular dystrophy: morphologic lesions, *J. Neurol. Sci.* 97 (1990) 1–23, [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(90\)90095-5](https://doi.org/10.1016/0022-510x(90)90095-5).
- [12] R. Rapisarda, F. Muntoni, P. Gobbi, V. Dubowitz, Duchenne muscular dystrophy presenting with failure to thrive, *Arch. Dis. Child.* 72 (1995) 437–438, <https://doi.org/10.1136/adc.72.5.437>.
- [13] B. El-Aloul, K.N. Speechley, Y. Wei, P. Wilk, C. Campbell, Fatigue in young people with duchenne muscular dystrophy, *Dev. Med. Child Neurol.* (2019), <https://doi.org/10.1111/dmcn.14248>.
- [14] M. Zatz, R.T. Betti, Benign duchenne muscular dystrophy in a patient with growth hormone deficiency: a five years follow-up, *Am. J. Med. Genet.* 24 (1986) 567–572, <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320240323>.
- [15] J.E. Anderson, L. Liu, E. Kardami, L.J. Murphy, The pituitary-muscle axis in mdx dystrophic mice, *J. Neurol. Sci.* 123 (1994) 80–87, [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(94\)90207-0](https://doi.org/10.1016/0022-510x(94)90207-0).
- [16] A.R. de Lima, J.R. Nyengaard, A.A. Jorge, et al., Muscular dystrophy-related quantitative and chemical changes in adenohypophysis GH-cells in golden retrievers, *Growth Hormon. IGF Res.* 17 (2007) 480–491, <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2007.06.001>.
- [17] L. Merlini, C. Granata, A. Ballestrazzi, et al., Growth hormone evaluation in duchenne muscular dystrophy, *Ital. J. Neurol. Sci.* 9 (1988) 471–475.
- [18] M. Zatz, R.T. Betti, O. Frota-Pessoa, Treatment of duchenne muscular dystrophy with growth hormone inhibitors, *Am. J. Med. Genet.* 24 (1986) 549–566, <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320240322>.
- [19] M. Zatz, D. Rapaport, M. Vainzof, et al., Effect of mazindol on growth hormone levels in patients with duchenne muscular dystrophy, *Am. J. Med. Genet.* 31 (1988) 821–833, <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320310415>.
- [20] M. Bodor, C.M. McDonald, Why short stature is beneficial in duchenne muscular dystrophy, *Muscle Nerve* 48 (2013) 336–342, <https://doi.org/10.1002/mus.23793>.
- [21] P.J. Collipp, J. Kelemen, S.Y. Chen, M. Castro-Magana, M. Angulo, A. Derenoncourt, Growth hormone inhibition causes increased selenium levels in duchenne muscular dystrophy: a possible new approach to therapy, *J. Med. Genet.* 21 (1984) 254–256, <https://doi.org/10.1136/jmg.21.4.254>.
- [22] M. Zatz, D. Rapaport, R.C. Pavanello, J.M. Rocha, M. Vainzof, W. Nicolau, Nocturnal rhythm of growth hormone in duchenne patients: effect of different doses of mazindol and/or cyproheptadine, *Am. J. Med. Genet.* 33 (1989) 457–467, <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320330408>.
- [23] J.H. Coakley, J. Moorcraft, L.J. Hipkin, C.S. Smith, R.D. Griffiths, R.H. Edwards, The effect of mazindol on growth hormone secretion in boys with duchenne muscular dystrophy, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 51 (1988) 1551–1557.
- [24] A. Cittadini, L. Ines Comi, S. Longobardi, et al., A preliminary randomized study of growth hormone administration in becker and duchenne muscular dystrophies, *Eur. Heart J.* 24 (2003) 664–672.
- [25] M.M. Rutter, J. Collins, S.R. Rose, et al., Growth hormone treatment in boys with duchenne muscular dystrophy and glucocorticoid-induced growth failure, *Neuromuscul. Disord.* 22 (2012) 1046–1056, <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2012.07.009>.
- [26] N. Klymiuk, A. Blutke, A. Graf, et al., Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle, *Hum. Mol. Genet.* 22 (2013) 4368–4382, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt287>.
- [27] T. Fröhlich, E. Kemter, F. Flenkenthaler, et al., Progressive muscle proteome changes in a clinically relevant pig model of duchenne muscular dystrophy, *Sci. Rep.* 6 (2016) 33362, <https://doi.org/10.1038/srep33362>.
- [28] B. Albl, S. Haesner, C. Braun-Reichhart, et al., Tissue sampling guides for porcine biomedical models, *Toxicol. Pathol.* 44 (2016) 414–420, <https://doi.org/10.1177/0192623316631023>.
- [29] W. Scherle, A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology, *Mikroskopie* 26 (1970) 57–60.
- [30] S. Tschanz, J.P. Schneider, L. Knudsen, Design-based stereology: planning, volumetry and sampling are crucial steps for a successful study, *Ann. Anat.* 196 (2014) 3–11, <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2013.04.011>.
- [31] A. Blutke, M.R. Schneider, E. Wolf, R. Wanke, Growth hormone (GH)-transgenic insulin-like growth factor 1 (IGF1)-deficient mice allow dissociation of excess GH and IGF1 effects on glomerular and tubular growth, *Phys. Rep.* 4 (2016) 1–18, <https://doi.org/10.14814/phy2.12709>.
- [32] A. Blutke, R. Wanke, Sampling strategies and processing of biobank tissue samples from porcine biomedical models, *J. Vis. Exp.* (2018), <https://doi.org/10.3791/57276>.
- [33] J.R. Nyengaard, H.J.G. Gundersen, The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens, *J. Microsc.* 165 (1992) 427–431, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1992.tb01497.x>.
- [34] C.V. Howard, M.G. Reed, Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy, 2nd ed., BIOS Scientific Publishers, Abingdon, 2005.
- [35] A. Blutke, M.R. Schneider, I. Renner-Muller, N. Herbach, R. Wanke, E. Wolf, Genetic dissection of IGF1-dependent and -independent effects of permanent GH excess on postnatal growth and organ pathology of mice, *Mol. Cell. Endocrinol.* 394 (2014) 88–98, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.07.002>.
- [36] A. Rieger, E. Kemter, S. Kumar, et al., Missense mutation of POU domain class 3 transcription factor 3 in Pou3f3L423P mice causes reduced nephron number and impaired development of the thick ascending limb of the loop of henle, *PLoS One* 11 (2016) e0158977, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158977>.
- [37] A. Hoefflich, M.M. Weber, T. Fisch, et al., Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) separates hypertrophic and hyperplastic effects of growth hormone (GH)/IGF1 excess on adrenocortical cells in vivo, *FASEB J.* 16 (2002) 1721–1731,

- <https://doi.org/10.1096/fj.02-0349com>.
- [38] C. Matenaers, B. Popper, A. Rieger, R. Wanke, A. Blutke, Practicable methods for histological section thickness measurement in quantitative stereological analyses, *PLoS One* 13 (2018) e0192879, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192879>.
- [39] D.C. Sterio, The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector, *J. Microsc.* 134 (1984) 127–136, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1984.tb02501.x>.
- [40] N. Herbach, I. Schairer, A. Blutke, et al., Diabetic kidney lesions of GIPRdn transgenic mice: podocyte hypertrophy and thickening of the GBM precede glomerular hypertrophy and glomerulosclerosis, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 296 (2009) F819–F829, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90665.2008>.
- [41] F. Dacheux, Functional differentiation of the anterior pituitary cells in the fetal pig: an ultrastructural immunocytochemical study, *Cell Tissue Res.* 235 (1984) 623–633, <https://doi.org/10.1007/bf00226961>.
- [42] F. Dacheux, Ultrastructural immunocytochemical localization of prolactin and growth hormone in the porcine pituitary, *Cell Tissue Res.* 207 (1980) 277–286, <https://doi.org/10.1007/bf00237812>.
- [43] J.P. Castaño, A. Ruiz-Navarro, M.M. Malagon, C. Hidalgo-Diaz, F. Gracia-Navarro, Secretory and morphological heterogeneity of porcine somatotropes during post-natal development, *J. Neuroendocrinol.* 9 (1997) 769–775.
- [44] M. Horsch, J. Beckers, H. Fuchs, et al., Uromodulin retention in thick ascending limb of Henle's loop affects SCD1 in neighboring proximal tubule: renal transcriptome studies in mouse models of uromodulin-associated kidney disease, *PLoS One* 9 (2014) e113125, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113125>.
- [45] C. Hoels, J.M. Rohrl, M.R. Schneider, M. Dahlhoff, The receptor tyrosine kinase ERBB4 is expressed in skin keratinocytes and influences epidermal proliferation, *Biochim. Biophys. Acta* 1862 (2018) 958–966, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.01.017>.
- [46] A. Hinrichs, B. Kessler, M. Kurome, et al., Growth hormone receptor-deficient pigs resemble the pathophysiology of human laron syndrome and reveal altered activation of signaling cascades in the liver, *Mol. Metab.* 11 (2018) 113–128, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.03.006>.
- [47] M. Bidlingmaier, N. Friedrich, R.T. Emeny, et al., Reference intervals for insulin-like growth factor-1 (igf1) from birth to senescence: results from a multicenter study using a new automated chemiluminescence IGF-I immunoassay conforming to recent international recommendations, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2014) 1712–1721, <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3059>.
- [48] J.S. Lee, K. Jeftinija, S. Jeftinija, M.H. Stromer, C.G. Scanes, L.L. Anderson, Immunocytochemical distribution of somatotrophs in porcine anterior pituitary, *Histochem. Cell Biol.* 122 (2004) 571–577, <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0715-8>.
- [49] J. Tinsley, N. Deconinck, R. Fisher, et al., Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice, *Nat. Med.* 4 (1998) 1441–1444, <https://doi.org/10.1038/4033>.
- [50] K.J. Perkins, K.E. Davies, The role of utrophin in the potential therapy of duchenne muscular dystrophy, *Neuromuscul. Disord.* (2002) S78–S89.
- [51] F. Nguyen, Y. Chereh, L. Guigand, I. Goubault-Leroux, M. Wyers, Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies, *J. Comp. Pathol.* 126 (2002) 100–108, <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0526>.
- [52] B. Wu, Y. Li, P.A. Morcos, T.J. Doran, P. Lu, Q.L. Lu, Octa-guanidine morpholino restores dystrophin expression in cardiac and skeletal muscles and ameliorates pathology in dystrophic mdx mice, *Mol. Ther.* 17 (2009) 864–871, <https://doi.org/10.1038/mt.2009.38>.
- [53] T. Yokota, Q.L. Lu, T. Partridge, et al., Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in duchenne dystrophy dogs, *Ann. Neurol.* 65 (2009) 667–676, <https://doi.org/10.1002/ana.21627>.
- [54] P.B. Shieh, Emerging strategies in the treatment of duchenne muscular dystrophy, *Neurother.* 15 (2018) 840–848, <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00687-z>.
- [55] L. Amoasii, J.C.W. Hildyard, H. Li, et al., Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of duchenne muscular dystrophy, *Sci.* 362 (2018) 86–91, <https://doi.org/10.1126/science.aau1549>.
- [56] D.J. Wells, Tracking progress: an update on animal models for duchenne muscular dystrophy, *Dis. Model. Mech.* 11 (2018), <https://doi.org/10.1242/dmm.035774>.
- [57] K. Nakamura, W. Fujii, M. Tsuboi, et al., Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system, *Sci. Rep.* 4 (2014) 5635, <https://doi.org/10.1038/srep05635>.
- [58] T. Sui, Y.S. Lau, D. Liu, et al., A novel rabbit model of duchenne muscular dystrophy generated by CRISPR/Cas9, *Dis. Model. Mech.* 11 (2018), <https://doi.org/10.1242/dmm.032201>.
- [59] A. Nakamura, S. Takeda, Mammalian models of duchenne muscular dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications, *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011) 184393, <https://doi.org/10.1155/2011/184393>.
- [60] N.J. Sharp, J.N. Kornegay, S.D. van Camp, et al., An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of duchenne muscular dystrophy, *Genomics* 13 (1992) 115–121.
- [61] P. Siciński, Y. Geng, A.S. Ryder-Cook, E.A. Barnard, M.G. Darlison, P.J. Barnard, The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation, *Sci.* 244 (1989) 1578–1580, <https://doi.org/10.1126/science.2662404>.
- [62] W.B. Im, S.F. Phelps, E.H. Copen, E.G. Adams, J.L. Slightom, J.S. Chamberlain, Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations, *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996) 1149–1153, <https://doi.org/10.1093/hmg/5.8.1149>.
- [63] E. Araki, K. Nakamura, K. Nakao, et al., Targeted disruption of exon 52 in the mouse dystrophin gene induced muscle degeneration similar to that observed in duchenne muscular dystrophy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238 (1997) 492–497, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7328>.
- [64] S.H. Yoon, M.D. Grynbas, J. Mitchell, Growth hormone increases bone toughness and decreases muscle inflammation in glucocorticoid-treated mdx mice, model of duchenne muscular dystrophy, *J. Bone Miner. Res.* 34 (2019) 1473–1486, <https://doi.org/10.1002/jbmr.3718>.
- [65] C.E. Ambrósio, M.C. Valadares, E. Zucconi, et al., Ringo, a golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dog with absent dystrophin but normal strength, *Neuromuscul. Disord.* 18 (2008) 892–893, <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.06.385>.
- [66] G.L. Walmsley, V. Arechavala-Gomez, M. Fernandez-Fuente, et al., A duchenne muscular dystrophy gene hot spot mutation in dystrophin-deficient cavalier king charles spaniels is amenable to exon 51 skipping, *PLoS One* 5 (2010) e8647, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008647>.
- [67] N. Klymiuk, F. Seeliger, Y.M. Bohlooly, A. Blutke, D.G. Rudmann, E. Wolf, Tailored pig models for preclinical efficacy and safety testing of targeted therapies, *Toxicol. Pathol.* 44 (2016) 346–357, <https://doi.org/10.1177/0192623315609688>.
- [68] Q.-C. Huang, Z.-R. Xu, X.-Y. Han, W.-F. Li, Effect of betaine on growth hormone pulsatile secretion and serum metabolites in finishing pigs, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91 (2007) 85–90, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2006.00644.x>.
- [69] S. Trifunovic, I. Lakić, P. Vujović, et al., Morphofunctional parameters of rat somatotrophs after acute and repeated immobilization or restraint stress, *Acta Histochem.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.10.003>.
- [70] E. Somn, N. Bonnet, A. Martinez, et al., A botulinum toxin-derived targeted secretion inhibitor downregulates the GH/IGF1 axis, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 3295–3306, <https://doi.org/10.1172/jci63232>.
- [71] K.-A. Dorph-Petersen, J.R. Nyengaard, H.J.G. Gundersen, Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size, *J. Microsc.* 204 (2001) 232–246, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2001.00958.x>.
- [72] R.W. Boyce, K.A. Dorph-Petersen, L. Lyck, H.J. Gundersen, Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number, *Toxicol. Pathol.* 38 (2010) 1011–1025, <https://doi.org/10.1177/0192623310385140>.
- [73] J.P. Schneider, M. Ochs, Alterations of mouse lung tissue dimensions during processing for morphometry: a comparison of methods, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 306 (2014) L341–L350, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00329.2013>.
- [74] C. Soendergaard, J.A. Young, J.J. Kopchick, Growth hormone resistance-special focus on inflammatory bowel disease, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017), <https://doi.org/10.3390/ijms18051019>.

Supplemental Protocol 1. Protocol for the immunohistochemical detection of growth hormone (GH) in paraffin- and in epoxy resin (Epon) sections of porcine pituitary tissue.

Step	Protocol
Dewaxing + Rehydration	Incubate slides for <i>20 min</i> in 100% xylol , <i>2x10 sec</i> 100 % ethanol , <i>2x10 sec</i> 96% ethanol <i>1x10 sec</i> 70 % ethanol , <i>1x10 sec</i> distilled water (dH ₂ O)
Blocking of endogenous peroxidase	Incubate slides in 1% H₂O₂ in TRIS buffered solution 1:10 at <i>23°C for 15 min</i>
Marking	Mark tissue area with a diamond needle
Etching + Rehydration	Incubate slides for <i>1 hr</i> in 2% sodium ethoxide solution , <i>2x2 min</i> 100 % ethanol , <i>2x2 min</i> 96% ethanol <i>1x10sec</i> 70 % ethanol , <i>1x10sec</i> distilled water
Blocking of endogenous peroxidase	Incubate slides in 2% H₂O₂ in TRIS buffered solution 1:10 at <i>23°C for 15 min</i>
Washing step	Wash slides with TRIS buffered solution 1:10 , <i>3x5 min</i>
Blocking	Incubate slides in 5% rabbit serum in TRIS buffered solution 1:10 , place slides in a humidified chamber at <i>23°C for 1 hr</i> , (do not wash away, just carefully wipe away blocking solution with laboratory paper towel)
Primary antibody incubation	Incubate with goat anti rat GH #AF 1665, Lot: JAU051609A (R&D Systems) transferred 1:1 with glycerol (Roth, Germany) and diluted 1:3000 in TRIS buffered solution 1:10 using 200-500 µl antibody solution per slide, depending on tissue area, in a humidified chamber at <i>4°C overnight</i> .
Washing step	Wash slides with TRIS buffered solution 1:10 , <i>3x5 min</i>
Secondary antibody incubation	Use Polyclonal rabbit anti-goat Igg/HRP (DAKO) , diluted 1:100 in TRIS buffered solution 1:10 with 2% pig serum in a humidified chamber at <i>23°C for 1 hr</i>
Washing step	Wash slides with TRIS buffered solution 1:10 , <i>3x5 min</i>
Colour development	Incubate with DAB substrate (ImmPACT™ DAB (SK-4105) (Vector laboratories; USA) for <i>20 sec</i>
Colour development	Incubate with DAB substrate (ImmPACT™ DAB (SK-4105) (Vector laboratories; USA) for <i>1 min 30 sec</i>
Washing step	Wash slides with tap water <i>5 min</i>
Counterstaining	Counterstain with Mayer's haemalaun (diluted 1:10 with distilled H ₂ O) for <i>25 sec</i>
Washing step	Wash slides with tap water <i>5 min</i>
Dehydration	Incubate slides in 70% ethanol , <i>2x</i> 96% ethanol , <i>2x</i> 100% ethanol , <i>5x</i> 100% xylol each for <i>10 sec</i>
Mounting	Mount using Histokitt Nr. 41025010 (Hecht, Germany)

 Protocol step only for paraffin sections

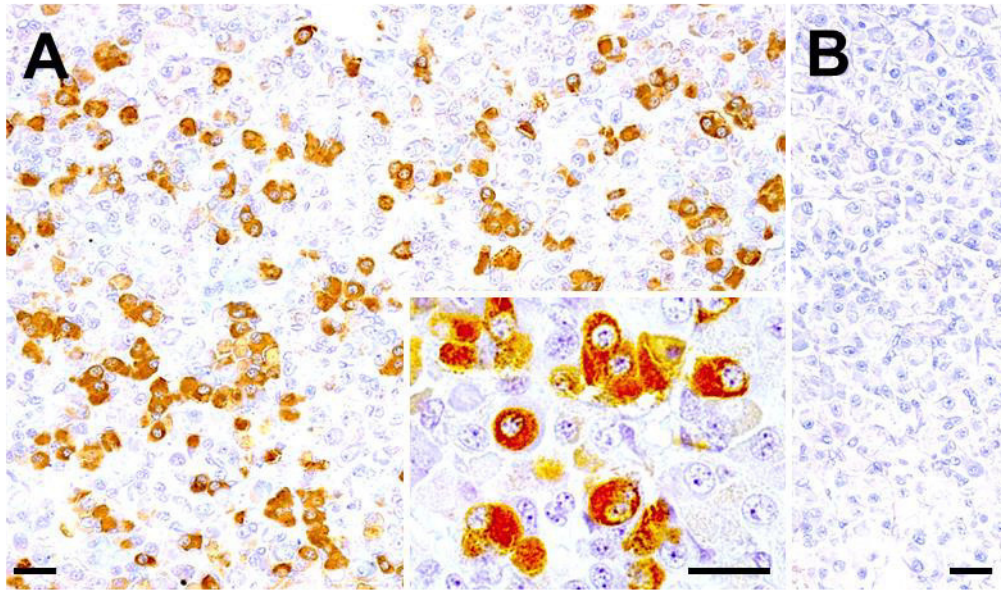
 Protocol step only for sections of Epon embedded tissue

Supplemental Protocol 2. Protocol for the detection of growth hormone (GH) in protein-lysate samples of porcine pituitary tissue by Western blot

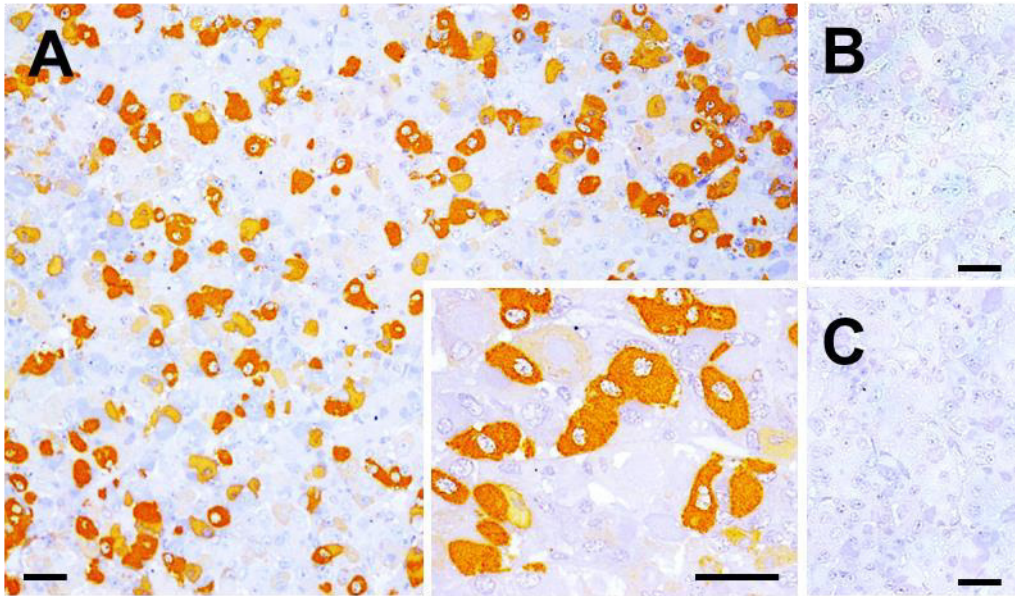
Step	Protocol
Activation	Incubate membrane for <i>1 min</i> with 100% methanol at 23°C .
Washing step	Wash membrane with TRIS buffered saline 1:10 with 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) (TBS-T): <i>1x15 min; 2x5 min</i>
Blocking	Incubate membrane for <i>1 hr</i> with TRIS buffered saline 1:10 with 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) (TBS-T) + 5% skimmed milk
Washing step	Wash membrane with TRIS buffered saline 1:10 with 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) (TBS-T): <i>1x 15 min; 2x 5 min</i>
Primary Antibody (anti GH)	Incubate membrane for <i>1,5 hr</i> with goat anti rat GH #AF 1665 (R&D Systems) transferred 1:1 with glycerol (Roth, Germany) and 1: 20 000 diluted in TRIS buffered saline 1:10 with 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) (TBS-T) + 5% bovine serum albumin (BSA) at 23°C .
Primary Antibody (anti GAPDH)	Incubate membrane overnight with 1:2000 diluted rabbit anti GAPDH #2118 (Cell Signaling) transferred 1:1 with glycerol (Roth, Germany) and 1:2000 diluted in TRIS buffered saline 1:10 with 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) (TBS-T) + 5% BSA at 4°C
Washing step	Wash membrane with TRIS buffered saline 1:10 with 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) (TBS-T): <i>1x15 min; 2x5 min</i>
Secondary antibody	Incubate membranes for <i>1 h</i> with polyclonal rabbit anti-goat Igg/HRP (DAKO), diluted 1:2000 in diluted in TRIS buffered saline 1:10 with 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) (TBS-T) at 23°C .
Secondary antibody	Incubate membranes for <i>1 h</i> with polyclonal goat anti-rabbit Igg/HRP (Cell Signaling), diluted 1:2000 in diluted in TRIS buffered saline 1:10 with 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) (TBS-T) at 23°C .
Washing step	Wash membrane with TRIS buffered saline 1:10 with 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) (TBS-T): <i>1x15 min; 2x5 min</i>
Chemiluminescent development	Incubate membranes for <i>1 min</i> ECL™ (Amersham™, GE Healthcare, UK)

goat anti rat GH antibody (R&D Systems #AF 1665, Lot JAU051609A)

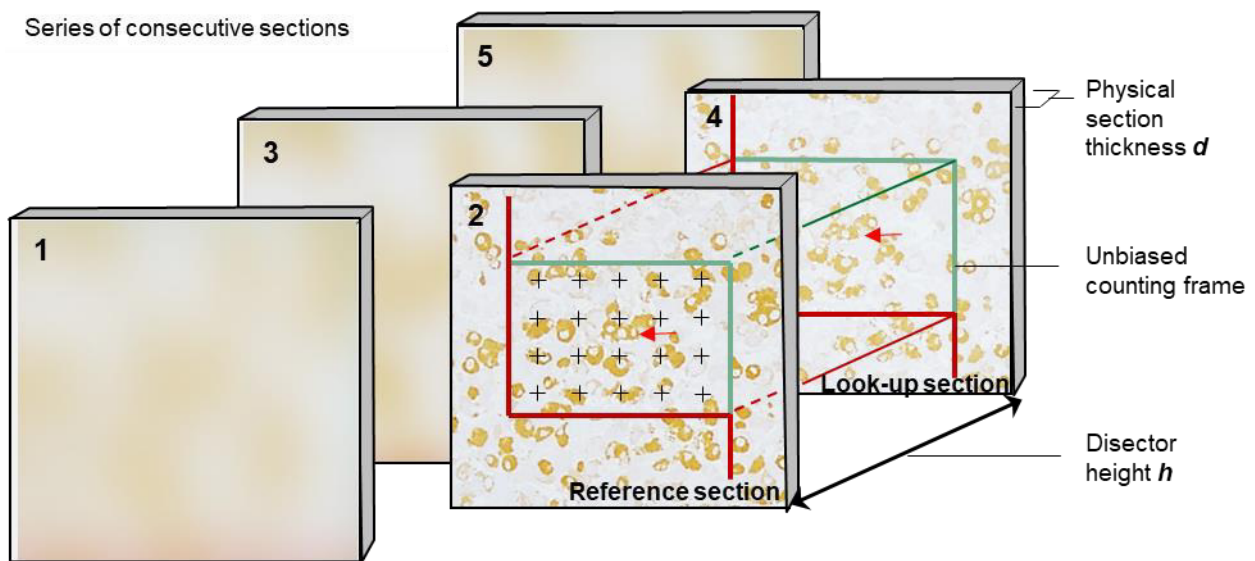
rabbit anti GAPDH antibody (Cell Signaling #2118)



Supplemental Figure 1. Immunohistochemical (IHC) detection of growth hormone in a section of paraffin (FFPE) embedded porcine pituitary gland tissue. IHC was performed with a goat anti rat GH primary antibody, using the protocol described above. **A:** Somatotroph cells display a strong immunoreactivity (brown color). **B:** Control section in which the primary antibody was omitted. Bars = 20 μ m



Supplemental Figure 2. Immunohistochemical (IHC) detection of growth hormone in a 0.5 μm semithin section of epoxy resin (Epon) embedded porcine pituitary gland tissue. IHC was performed with a goat anti rat GH primary antibody, using the protocol described above. **A:** Somatotroph cells display a strong immunoreactivity (brown color). **B:** Control section incubated with the identical concentration of an irrelevant primary (goat) antibody, detecting feline leukemia virus antigen. **C:** Control section in which the primary antibody was omitted. Bars = 20 μm



Supplemental Figure 3. Illustration of the physical disector analysis method principle for counting of somatotroph cells in pairs of serial IUR semithin sections of plastic resin embedded adenohipophyseal tissue samples. From a series of consecutive semithin sections, two sections with a defined distance are randomly sampled (here: sections N°2 and N°4). One section is designated as the “**reference section**”, the second as the “**look-up section**”. The distance of the focus planes of the two sections (*i.e.*, the disector height, h) is defined by the physical thickness (d) of the sections. Here, the disector height is $h = 2d$ (for sections with a thickness of 0.5 μm , the disector height between the reference and the look-up section in the presented example would be 1 μm). In a disector experiment, the disector height should not exceed 1/3rd of the minimal orthogonal linear projection of the size of the particles to be counted. To sample/count nuclei of somatotroph cells, a disector height of 1 μm is appropriate). Somatotroph cells are identified by immunohistochemical detection of growth hormone (brown color). The reference and look-up section are aligned, and unbiased counting frames are superimposed on corresponding (systematically randomly sampled) section areas. The area of the unbiased counting frames and the disector height define a 3D test-volume. Somatotroph cell nuclei (*i.e.*, cells, since somatotrophs only have a single nucleus) are counted within this disector volume. Following the rules for counting with unbiased counting frames, cell nuclei are counted, if a section profile of a somatotroph nucleus is present within the area of the unbiased counting frame in the reference section, but absent in the “Look-up” section. (Particles are only counted, if their section profiles are completely located within the boundaries of the counting frame, or, if they touch at least one of the green (*i.e.*, allowed) lines but none of the red (*i.e.*, forbidden) lines). In the shown example, red arrows mark a somatotroph cell nucleus that is sectioned in the reference section but not in the look-up section and is therefore counted. Additionally, the relative section areas of the adenohipophyseal tissue within the area of the unbiased counting frame, as well as of somatotroph cell profiles within the section area of adenohipophyseal tissue are determined by point counting (in the shown example, a cross grid is superimposed on the reference section). The numerical volume density of somatotroph cells in the adenohipophysis is then calculated from the number of counted cells and the volumes of adenohipophyseal tissue in all analyzed disectors per case, as shown in the Materials and Methods section.

4 DISKUSSION

4.1 Grundlagen und Ziele der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die morphologische und funktionelle Charakterisierung adenohipophysärer Alterationen in einem porzinen Modell der Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) mit erwartungstreuen, quantitativ-stereologischen Verfahren und biochemischen Analysen. Das im Rahmen dieser Studie untersuchte, porzine Modell der DMD wurde 2013 am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie von Klymiuk *et al.* generiert [28,262].

Kleinwüchsigkeit stellt beim Menschen ein bekanntes Phänomen der DMD-Erkrankung dar, das bis zu 30 % der Patienten betrifft [12–14]. Die Wachstumskurven der DMD-Patienten liegen generell unter denen von gleichaltrigen gesunden Kindern [15,176]. Die Ursachen für ein initial verzögertes Längenwachstum der Patienten sind bis heute trotzdem weitgehend unklar [16]. Ein möglicher Zusammenhang mit dem GH/IGF1-System [22,30] sowie ein potenziell abgemilderter Krankheitsverlauf bei kleineren und leichteren Patienten, durch eine geringere mechanische Belastung der Muskeln, werden diskutiert [21,22]. Vor diesem Hintergrund ist auch der therapeutische Einsatz von GH bei kleinwüchsigen DMD-Patienten umstritten. Diese therapeutische Intervention wird vor allem zur Abmilderung der Wachstumsstörungen eingesetzt, die als einer der Nebeneffekte der kontinuierlichen Gabe von Kortikosteroiden auftreten [23]. In einigen Fällen kommt es in Folge der kontinuierlichen Kortikosteroidgabe zu einer Reduktion der Körpergröße von bis zu 25 cm verglichen mit durchschnittlich großen, gleichaltrigen gesunden Kindern [179].

Anderson *et al.* [263] untersuchten 1994 erstmals die somatotropen Zellen der Adenohipophyse im mdx Modell [263]. Mittels elektronenmikroskopischer Analyse konnte ein hypertrophes Wachstum der somatotropen Zellen von mdx Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren nachgewiesen werden und mit Hilfe eines *Radioimmunoassay* (RIA) ein erhöhter Gehalt an GH in der Adenohipophyse von mdx Mäusen ermittelt werden [263].

Diese Befunde wurden als Hinweis auf eine gesteigerte Sekretion von GH gewertet. Eine quantitative Analyse der strukturellen Veränderungen der Adenohypophyse wurde allerdings nicht durchgeführt [263].

Ebenso fehlen bei humanen DMD-Patienten bislang quantitativ-stereologische Untersuchungen der Adenohypophyse, die potenzielle adenohypophysäre Alterationen in einen Kontext mit funktionellen Auswirkungen auf das GH/IGF1-System setzen. Im Jahr 2007 wurde von de Lima *et al.* [30] erstmals eine quantitativ-stereologische Untersuchung der Adenohypophyse im GRMD-Modell publiziert, die quantitativ-morphologische Alterationen der somatotropen Zellen innerhalb der Adenohypophyse nachweisen konnte. Bei muskeldystrophen Hunden konnten im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren ein erhöhtes Volumen somatotroper Zellen in der Adenohypophyse und ein erhöhtes Volumen der GH-Granula in den einzelnen somatotropen Zellen nachgewiesen werden [30]. De Lima *et al.* bestimmten die Serum-IGF1-Konzentrationen von GRMD-Hunden und gesunden Kontrolltieren monatlich über sechs Monate hinweg mittels RIA und konnten signifikant geringere Werte bei GRMD-Hunden im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren feststellen [30]. Eine schwerwiegende Symptomatik ging bei den GRMD-Hunden mit stark erniedrigten Konzentrationen von IGF1 im Serum einher [30]. Aus diesen Ergebnissen wurde auf eine gestörte Sekretion von GH bei GRMD-Hunden im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren geschlossen [30].

Im genetisch maßgeschneiderten porzinen DMD-Modell wiesen die Tiere mit einem höheren Geburtsgewicht gegenüber leichteren Wurfgeschwistern eine schwerwiegendere klinische Symptomatik und höhere Sterblichkeitsraten auf [28,262]. Zur Beantwortung der Frage, ob und in welchem Ausmaß adenohypophysäre Alterationen auch im porzinen DMD-Modell auftreten, wurden in der vorliegenden Studie die relevanten Strukturparameter der Hypophysen von sechs DMD-Tieren im Alter von drei Monaten und von fünf gleichaltrigen männlichen Kontrolltieren mit quantitativ-stereologischen Methoden untersucht. Die GH-Abundanz in der Adenohypophyse von DMD-Schweinen und Kontrolltieren wurde in der Studie am porzinen DMD-Modell, als Pendant zur quantitativ-stereologischen Untersuchung mittels Western Blot-Verfahren erhoben. Außerdem wurden die Serumkonzentrationen von GH und IGF1 der Tiere bestimmt.

Die Entnahme von Serum und frischen Gewebeproben bildete den Ausgangspunkt für die biochemischen Untersuchungen. Die Ermittlung des Volumens der Hypophyse und die anschließende sorgfältige, systematisch-zufällige Beprobung der Adenohypophyse bildete die Basis für die quantitativen licht- und elektronenmikroskopischen Analysen (siehe Abschnitt 4.3). Im Rahmen dieses Dissertationsprojekts wurde, als Voraussetzung für die erwartungstreue Ermittlung der numerischen Volumendichte von somatotropen Zellen in der Adenohypophyse, ein Protokoll zur eindeutigen immunhistochemischen Identifizierung von GH in histologischen Schnittpräparaten von hypophysären Gewebeproben, die zuvor in ein Kunststoffmedium eingebettet wurden, etabliert (siehe Abschnitt 4.4.2) [32].

Die vorliegende Studie ergab keine Hinweise auf zelluläre und ultrastrukturelle Veränderungen somatotroper Zellen der DMD-Schweine, die das reduzierte Wachstum von DMD-Tieren im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrolltieren erklären könnte. Lediglich die absolute Anzahl der somatotropen Zellen in der Adenohypophyse war bei den leichteren DMD-Schweinen proportional zum Körpergewicht reduziert (Für mögliche Ursachen dieser Reduktion siehe Abschnitt 4.4.3) [32]. Die reguläre Morphologie der somatotropen Zellen auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene und die im Western Blot-Verfahren ermittelte, vergleichbare Abundanz von GH innerhalb der Adenohypophyse von DMD- und Kontrolltieren lässt keine Rückschlüsse auf eine eingeschränkte Synthese, Speicherung und Ausschüttung von GH im porzinen DMD-Modell zu. Die Serumkonzentrationen von GH und IGF1 wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen auf. Die Messungen der Serumkonzentrationen von GH und IGF1 erfolgten in der vorliegenden Studie am porzinen Modell lediglich zu einem singulären Zeitpunkt mit Hilfe eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Serum-GH-Konzentrationen wiesen eine hohe Variabilität auf. Die Serum-IGF1-Konzentrationen von DMD-Tieren waren im Vergleich zu denen der Kontrolltiere reduziert, dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant. Die Konzentrationsbestimmung von GH im Serum wird in der vorliegenden Studie, aufgrund der pulsatilen Ausschüttung von GH beim Schwein, als nicht aussagekräftig erachtet [110,264].

Der Serumkonzentration von IGF1 kommt, aufgrund der unterschiedlichen Zeitpunkte der Serumentnahme im Tagesverlauf bei den verschiedenen Tieren, aber auch generell bezogen auf seine Aussagekraft im Hinblick auf das Körperwachstum, eine untergeordnete Rolle zu [34].

Die Ergebnisse aus den quantitativ-stereologischen Analysen werden im Folgenden vor dem Hintergrund der Wahl des Tiermodells und der in der Studie verwendeten quantitativ-stereologischen Verfahren diskutiert (siehe Abschnitt 4.2 und 4.3). Dabei wird insbesondere Bezug genommen auf die differierenden Ergebnisse aus der quantitativ-morphologischen Studie der adenohipophysären Alterationen im GRMD-Model von de Lima *et al.* [30] (siehe Abschnitt 4.4). Die Übertragbarkeit und Verlässlichkeit der Untersuchungsergebnisse aus den beiden muskeldystrophischen Tiermodellen auf das Phänomen der Kleinwüchsigkeit von humanen DMD-Patienten wird besonders im Hinblick auf die methodischen Unterschiede in den beiden Studien diskutiert (siehe Abschnitt 4.4.2).

4.2 Eignung des porzinen DMD-Modells zur Untersuchung von hypophysären Alterationen

Das in dieser Arbeit verwendete porzine Modell der menschlichen Duchenne-Muskeldystrophie repräsentiert das erste maßgeschneiderte, genetisch modifizierte Großtiermodell der Erkrankung [28]. Die Schweine tragen eine Mutation im *DMD* Gen, die auch eine häufige Ursache der menschlichen Erkrankung darstellt [28]. Die Modifikation des Exon 52 führt im porzinen DMD-Modell in der Konsequenz zum Verlust des Muskelfasermembranproteins „Dystrophin“ [28]. Das porzine DMD-Modell stellt ein überaus gut charakterisiertes Modell, hinsichtlich der auftretenden histopathologischen Veränderungen in der Skelettmuskulatur, des progressiven klinischen Verlaufs [28] und der Veränderungen im Skelettmuskel auf Proteomebene [217] dar. Die Schweine entwickeln analog zum menschlichen Krankheitsbild eine progressive Muskelschwäche und weisen in der Folge eine eingeschränkte Mobilität auf, hinzu kommen typischerweise erhöhte Serum-CK-Konzentrationen. In der histopathologischen Untersuchung weisen die DMD-Schweine charakteristische Anzeichen von Faserdegenerations- und Faserregenerationsprozessen auf. Die Tiere weisen eine Variation der Muskelfaserdurchmesser mit zahlreichen abgerundeten Muskelfasern mit zentralständigen Zellkernen, aufgespaltene Muskelfasern und Gruppen von nekrotischen sowie stark kontrahierten Muskelfasern auf. Diese Veränderungen gingen mit einer interstitiellen mononukleären Entzündungszellinfiltration und Anzeichen einer chronischen Entzündung, interstitieller Fibrose und Lipomatose einher. Zwischen den Abschnitten mit nekrotischen Muskelfasern finden sich kleine regenerierende Muskelfasern. Die histopathologischen Veränderungen ähneln denen, die bei DMD-Patienten regelmäßig auftreten und betreffen bei den DMD-Schweinen ein breites Spektrum von Skelettmuskeln des Stammes, der Gliedmaßen und des Kopfes (inklusive Kehlkopfmuskeln und Zunge) sowie die Atemmuskulatur [28]. Der Schweregrad dieser Veränderungen zeigte eine progressive Zunahme mit dem Alter der Tiere [28]. Insgesamt weisen die Schweine einen im Vergleich zum Menschen deutlich akzelerierten Krankheitsverlauf auf und erreichen dabei ein Alter von bis zu drei Monaten [28].

Die mit Hilfe von *somatic cell nuclear transfer* (SCNT) generierten DMD-Schweine, wiesen außerdem eine hohe Variation der Geburtsgewichte innerhalb eines Wurfes auf. Hierbei könnte es sich um ein Phänomen handeln, das regelmäßig in Verbindung mit der SCNT-Technik beobachtet wird und unter anderem häufig in Folge kleinerer Wurfgrößen auftritt [265]. Die DMD-Tiere mit einem höheren Geburtsgewicht weisen einen schwereren Krankheitsverlauf und eine geringere Lebenserwartung im Vergleich zu ihren leichteren Wurfgeschwistern auf [28,262]. Dieses Phänomen ist besonders interessant im Hinblick auf die, in einigen Fällen beobachtete, länger anhaltende Geh- und Stehfähigkeit von kleineren und leichteren DMD-Patienten [15,19,22].

Das porzine DMD-Modell stellt somit ein gut charakterisiertes, einzigartiges Großtiermodell der Duchenne-Muskeldystrophie dar [28,217,262,266]. Im Vergleich zum gängigen Mausmodell (mdx) zeigen die muskeldystrophen Schweine eine fulminante klinische Erscheinung, die im Gegensatz zum muskeldystrophen GRMD-Modell eine geringe Variabilität aufweist [26–28,184].

Die typischen Kennzeichen der menschlichen DMD-Erkrankung auf histopathologischer und klinischer Ebene qualifizieren das porzine DMD-Modell als geeignetes Modell für die grundsätzliche Erforschung der Pathogenese der DMD [28,262] sowie für die translationale medizinische Forschung zur Entwicklung und Erprobung von neuen therapeutischen Strategien [7] und diagnostischen Verfahren [219]. Vor dem Hintergrund der bislang nicht abschließend geklärten Rolle des GH/IGF1-Systems bei der Kleinwüchsigkeit von DMD-Patienten und aufgrund von kontroversen Ergebnissen verschiedener Studien mit dystrophen Tiermodellen, mdx-Modell, (erhöhte GH-Sekretion) [263] und GRMD-Modell (gestörte GH-Sekretion) [30], wurde im porzinen DMD-Modell die potenzielle Rolle des GH/IGF1-Systems im Krankheitsbild, mit Hilfe einer quantitativ-stereologischen Untersuchung der Adenohypophyse, eingehend charakterisiert.

4.3 Eignung der eingesetzten Verfahren zur Ermittlung quantitativ-morphologischer Parameter der Hypophyse

Zur quantitativ-stereologischen Analyse adenohipophysärer Alterationen kamen im Rahmen dieser Arbeit modellunabhängige, quantitativ-stereologische Methoden zum Einsatz, die dem gegenwärtigen Stand der Technik zur erwartungstreuen quantitativen Schätzung von morphologischen Strukturen entsprechen [225,226]. Die Ermittlung der quantitativ-stereologischen Parameter der Hypophyse von DMD- und Kontrollschweinen in der vorliegenden Studie erfolgte nach einem strikten systematisch-zufälligen (SUR) Probennahmeverfahren [246].

Zunächst wurde das Volumen jeder einzelnen Hypophyse (Referenzkompartimentvolumen), nach dem archimedischen Prinzip (Submersionsmethode) ermittelt, das sich für kleine Organe gut eignet [249,252,253]. Zunächst wurde die Hypophyse systematisch-zufällig planparallel, äquidistant (1 mm) lamelliert und in Paraffin eingebettet. In den anschließend hergestellten histologischen Schnittpräparaten wurden die Volumendichten der Adenohipophyse innerhalb der Gesamthypophyse ($V_{V(\text{Adenohipophyse/Hypophyse})}$) und der somatotropen Zellen innerhalb der Adenohipophyse ($V_{V(\text{somatotrope Zellen/Adenohipophyse})}$) bestimmt. Die Ermittlung der Volumendichten wurde, anhand der Flächendichten der Anschnittprofile der Adenohipophyse, respektive der somatotropen Zellen am jeweiligen Referenzkompartiment mittels Punktzählung ermittelt (Prinzip von Delesse) [225,227,244]. Die Anzahl der gezählten Punkte im jeweiligen Referenzkompartiment wurde für die erwartete Volumendichte der jeweiligen Struktur so gewählt, dass die erwartete relative Fehlerwahrscheinlichkeit des Schätzergebnisses bei maximal 5 % der Volumendichte lag [227]. Zur Ermittlung der numerischen Volumendichte somatotroper Zellen innerhalb der Adenohipophyse ($N_{V(\text{somatotrope Zellen/Adenohipophyse})}$) sowie zur elektronenmikroskopischen Ermittlung der Volumendichte der GH-Granula pro einzelner somatotroper Zelle ($V_{V(\text{GH-Granula/somatotrope Zelle})}$) wurden Semi- beziehungsweise Ultradünnschnittpräparate untersucht, die aus systematisch-zufällig ausgewählten Proben der Adenohipophyse hergestellt wurden.

Bei der Auswahl der zu beprobenden Gewebelokalisationen innerhalb der Adenohypophyse wurde ein effizientes, etabliertes, systematisch-zufälliges (SUR)-Probennahmeverfahren angewandt [227,244]. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Volumendichte von somatotropen Zellen innerhalb der Adenohypophyse ($V_{V(\text{somatotrope Zellen/Adenohypophyse})}$) zwischen den gewonnenen Stichproben und dem übrigen adenohypophysären Gewebe bei DMD- und Kontrolltieren. Dies belegt die adäquate Repräsentativität der Stichproben hinsichtlich der Volumendichte somatotroper Zellen innerhalb der Adenohypophyse ($V_{V(\text{somatotrope Zellen/Adenohypophyse})}$). Um die Richtungsunabhängigkeit sowie eine gleichmäßige und geringe Schrumpfung [242] der Gewebeproben, als Voraussetzungen für die akkurate Bestimmung der numerischen Volumendichte der somatotropen Zellen in der Adenohypophyse ($N_{V(\text{somatotrope Zellen/Adenohypophyse})}$) mit Hilfe des physikalischen Disektorverfahrens [241] zu gewährleisten, erfolgte eine Randomisierung der Schnittflächen mit Hilfe des Isector-Verfahrens [254] und die Einbettung der Proben in Epon [242,261]. Die exakte Schnittdicke der hergestellten Semidünnschnitte, mit einer nominellen Schnittdicke von $0,5 \mu\text{m}$, wurde spektral reflektometrisch bestimmt [260]. Anschließend erfolgte die Anwendung des physikalischen Disektorverfahrens an systematisch-zufällig ausgewählten Schnittpaaren einer Serie aus Semidünnschnitten. Zur eindeutigen Identifizierung der somatotropen Zellen, in Abgrenzung zu anderen Zellarten insbesondere zu laktotropen Zellen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein spezielles Protokoll zur gezielten immunhistochemischen Darstellung somatotroper Zellen in Epon-Semidünnschnitten etabliert.

Die erfolgreiche Etablierung eines immunhistochemischen Protokolls zur Identifizierung somatotroper Zellen in Eponschnittpräparaten der Adenohypophyse, stellte eine grundsätzliche Voraussetzung zur Differenzierung der Zellen für die nachfolgenden quantitativ-sterologischen Untersuchungen dar. Bei der Zählung der somatotropen Zellen innerhalb der definierten Disektorvolumina wurde der Zellkern somatotroper Zellen, als Zielstruktur gewählt, da er pro Zelle nur einmal vorhanden ist [84]. Die so gewonnenen quantitativen Ergebnisse ermöglichten den statistischen Vergleich zwischen DMD- und Kontrolltieren.

Diese Befunde zeigen, dass die systematisch-zufällige Probennahmestrategie und die quantitativ- stereologischen Verfahren, die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommen sind, in besonderem Maße geeignet sind, für die sensitive Detektion geringer Veränderungen in der porzinen Adenohypophyse. Das Volumen der Gesamthypophyse, der Adenohypophyse, die Anzahl und das mittlere Volumen somatotroper Zellen in der Adenohypophyse sowie das Volumen der GH-Granula pro einzelner somatotroper Zelle konnten auf diese Weise adäquat und erwartungstreu geschätzt und verglichen werden.

4.4 Vergleich der unterschiedlichen quantitativ-morphologischen Befunde der Adenohypophyse im porzinen DMD-Modell und im kaninen GRMD-Modell

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zur quantitativ-morphologischen und funktionellen Analyse der Hypophyse zeigen, dass im porzinen Modell der Duchenne-Muskeldystrophie keine strukturellen Alterationen der somatotropen Zellen in der Adenohypophyse auftreten, die Rückschlüsse auf eine veränderte GH-Sekretion bei DMD-Schweinen zulassen. Die quantitativ-stereologische Analyse leistet somit einen Beitrag zur umfassenden Charakterisierung des ersten maßgeschneiderten Großtiermodells der Duchenne-Muskeldystrophie. Die Ergebnisse dieser Studie stehen im Kontrast zu den Befunden von de Lima *et al.* [30], die auf strukturelle Veränderungen der somatotropen Zellen und ihrer intrazellulären Granula bei muskeldystrophen Hunden hinweisen, die funktionelle Auswirkungen auf die GH-Sekretion im GRMD-Modell haben könnten. Bei menschlichen DMD-Patienten existieren derzeit keine vergleichbaren quantitativ-morphologischen Studien im Hinblick auf adenohypophysäre Alterationen. In einer Reihe von funktionellen Studien an DMD-Patienten konnte kein Hinweis auf eine generell gestörte GH-Sekretion gefunden werden, die in einem ursächlichen Zusammenhang mit einer Wachstumsstörung bei DMD-Patienten stehen könnte [13,194]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, stehen somit im Einklang mit anderen Forschungsergebnissen, die keine eingeschränkte GH-Sekretion bei einer Mehrheit der DMD-Patienten feststellen konnten [13,16,194]. Die vorliegende Arbeit [32] und die Studie von de Lima *et al.* [30], stellen die bislang einzigen quantitativ-stereologischen Untersuchungen der Adenohypophyse in DMD-Großtiermodellen dar. Die unterschiedlichen methodischen Aspekte und Ergebnisse werden in diesem Kapitel vergleichend diskutiert.

In der Studie am GRMD-Modell, untersuchten de Lima *et al.* [30] mit modellunabhängigen, quantitativ-stereologischen Methoden die Adenohypophyse und die somatotropen Zellen von drei muskeldystrophen Hunden und zwei gesunden Kontrolltieren. Das Gesamtvolumen der Adenohypophyse wurde nach dem Prinzip von Cavalieri, aus den Flächenanteilen der Adenohypophyse, und der Schnittdicke der lamellierten Adenohypophyse, bestimmt [225,226,245].

Die Volumendichte somatotroper Zellen innerhalb der Adenohypophyse wurde auf der Basis der Flächendichte ihrer Zellanschnittsprofile, mittels Punktezahlung nach dem Prinzip von Delesse, ermittelt [227]. Hierfür wurden systematisch-zufällig (SUR) ausgewählte Gefrierschnitte aus einer Hälfte der Adenohypophyse verwendet, in denen die somatotropen Zellen mittels Immunfluoreszenz dargestellt werden konnten [30]. In der kontralateralen Hälfte der Adenohypophyse, wurde die numerische Volumendichte somatotroper Zellen in der Adenohypophyse und das mittlere Volumen somatotroper Zellen in systematisch-zufälligen (SUR) Gesichtsfeldern, mit Hilfe des Disektorverfahrens an Toluidinblau gefärbten Kunststoffschnitten bestimmt [30]. Zur Identifikation der somatotropen Zellen, in den verwendeten Kunststoffschnitten, diente de *Lima et al.* der direkte Vergleich des Musters, der mittels Immunfluoreszenz dargestellten somatotropen Zellen, in den Gefrierschnitten der kontralateralen Hälfte der Hypophyse (siehe Abschnitt 4.4.2) [30]. Die Volumendichte der GH-Granula in somatotropen Zellen wurde elektronenmikroskopisch in systematisch-zufällig ausgewählten (SUR)-Proben und Gesichtsfeldern erfasst.

De Lima *et al.* [30] konnten keinen signifikanten Unterschied im Gesamtvolumen der Adenohypophyse zwischen GRMD-Hunden und gesunden Kontrolltieren feststellen. Das mittlere Volumen der somatotropen Zellen der muskeldystrophen Hunde war im Vergleich zu den Kontrolltieren um 32,4 % größer ($p=0,01$) und der Anteil somatotroper Zellen am Volumen der Adenohypophyse war im Vergleich zu gesunden Kontroll-Hunden signifikant um 62,5 % erhöht ($p=0,01$). Die Anzahl der somatotropen Zellen in der Adenohypophyse unterschied sich nicht signifikant zwischen beiden Gruppen. Auf ultrastruktureller Ebene konnte im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren zudem ein signifikant erhöhter Volumenanteil der GH-Granula um 66,9 % pro einzelner somatotroper Zelle von GRMD-Hunden festgestellt werden.

Das erhöhte Volumen der GH-Granula in den einzelnen somatotropen Zellen von GRMD-Hunden wurde in der Studie von de *Lima et al.* [30], als ein Hinweis auf eine gestörte Exozytose der GH-Granula interpretiert und als mögliche Erklärung für die Hypertrophie der somatotropen Zellen und die erniedrigten Konzentrationen von IGF1 im Serum von GRMD-Hunden herangezogen.

Die Autoren schlossen nicht aus, dass Dystrophin eine entscheidende Rolle im Exozytose Prozess der GH-Granula zukommen könnte. [30]. De Lima *et al.* vermuteten, dass der Mangel an Dystrophin eine Instabilität der Membran der intrazellulären GH-Granula bedingen könnte und es dadurch zu einer eingeschränkten Ausschleusung der GH-Granula kommen könnte [30]. Für eine potenzielle Beteiligung des Dystrophins, im Exozytoseprozess der GH-Granula, spricht der Befund einer frühen *Dmd* Gen-Expression während der Embryogenese der Maus, im Bereich der Rathke'schen Tasche und der Vorläuferläuferzellen, die den endokrinen Teil der Hypophyse bilden [267]. Die kurzen Dystrophinisoformen (Dp71 und Dp40) sind außerdem potenziell an der Neurosekretion der Neurohypophyse, über eine Stabilisierungsfunktion der Zellorganellen [268] und an der synaptischen Transmission beteiligt [269,270]. Diesen Dystrophinformen wird auch eine Rolle bei der Gehirnfunktion insbesondere über eine Veränderung der synaptischen Plastizität zugeschrieben [271]. Dp 40 interagiert im Gehirn von Mäusen mit einer Reihe von präsynaptischen Proteinen, darunter Syntaxin1A und *synaptosomal nerve-associated protein 25* (SNAP25), und ist am Exozytoseprozess von synaptischen Vesikeln beteiligt [270].

Bei Dp71-defizienten Mäusen kommt es in den Synapsen des Hippocampus teilweise zu einer Abnahme der Dichte der Vesikel, die sich in der Nähe der aktiven Zone befinden sowie zu einer Zunahme der Vesikelgröße und der Breite des synaptischen Spalts [269]. Ebenfalls wurde eine mögliche Rolle der Dystrophinisoform Dp71 in der Wachstumsregulation im Jahr 2017 von Matsumoto *et al.* vermutet, da beim Menschen Mutationen im *DMD* Gen, die zum Verlust dieser Dystrophinisoform führen, häufiger mit Kleinwüchsigkeit assoziiert sind [12].

Allerdings konnte die von de Lima *et al.* [30] beschriebene Hypertrophie somatotroper Zellen, als Folge einer Sekretionsstörung nicht in einer Studie von Somm *et al.* aus dem Jahr 2012 bestätigt werden. Somm *et al.* hemmten die GH-Sekretion von Ratten gezielt mit Hilfe eines von Botulinumtoxin abgeleiteten Inhibitors [272]. Interessanterweise führte die gezielte Hemmung der GH-Sekretion an den somatotropen Zellen der Ratten zu einer Atrophie der Adenohypophyse und zu einer reduzierten Abundanz von GH in der Adenohypophyse im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren.

Eine Erklärung für diesen Effekt, könnte ein potenzieller intrazellulärer Feedbackmechanismus liefern, der in Folge einer gestörten Fusion der GH-Granula, eine *de novo* Synthese von GH-Granula in der Zelle unterdrückt [68,272].

Denkbar wäre auch, ein negativer Einfluss der gehemmten GH-Sekretion auf die Feedbackschleife, die eine Rolle bei der Regulation der GH-Ausschüttung durch die hypothalamischen Hormone GHRH und SIH ausübt [44,47,58]. Eine Atrophie der Adenohypophyse in der Studie von Somm *et al.* [272] könnte auch von einem lokalen toxischen Effekt, des Botulinumtoxinderivats auf benachbarte endokrine Zellen der Adenohypophyse, stammen [273]. Gegen einen generellen toxischen Effekt auf die Hypophyse der behandelten Ratten spricht der Befund, einer selektiv reduzierten Expression des *Gh1* Gens, wohingegen die Expression des Prolaktin-Gens zunahm [272].

In der quantitativ-stereologischen Untersuchung der Adenohypophyse im porzinen DMD-Modell ergab sich ein grundsätzlich anderes Bild [32]. Die muskeldystrophen Schweine wiesen im Durchschnitt ein um 55 % reduziertes Körpergewicht gegenüber gleichaltrigen Kontrolltieren auf ($p < 0,01$). Das Hypophysengewicht der DMD-Tiere war um 35 % reduziert ($p < 0,05$). Das Volumen der Adenohypophyse war bei den DMD-Schweinen um ein Drittel reduziert ($p = 0,05$). Das Volumen der somatotropen Zellen in der Adenohypophyse war bei DMD-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren um die Hälfte reduziert ($p < 0,01$). Dieser Volumenunterschied basierte auf einer signifikant geringeren Anzahl (-50 %) somatotroper Zellen in der Adenohypophyse ($p < 0,05$). Hinsichtlich des mittleren Zellvolumens der somatotropen Zellen konnte anders, als in der Studie von de Lima *et al.* [30] in der vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied zwischen DMD-Schweinen und Kontrolltieren festgestellt werden [32]. Es lag auch kein Unterschied des Gesamtvolumens der GH-Granula bezogen auf die einzelne somatotrope Zelle zwischen den beiden experimentellen Gruppen vor. Im Rahmen der zusätzlich durchgeführten Western Blot-Analyse zeigten DMD- und Kontrolltiere ebenfalls keinen Unterschied hinsichtlich der Abundanz von GH in der Adenohypophyse. Zwischen dem Körpergewicht und dem Hypophysengewicht auf der einen Seite und der Anzahl der somatotropen Zellen auf der anderen Seite, ergab sich eine signifikant positive Korrelation bei allen untersuchten Tieren ($r^2 = 0,86$ und $r^2 = 0,80$) [32].

Als Ursache(n) für die diskrepanten Ergebnisse der Analysen der Studie von de Lima *et al.* [30] und der vorliegenden Arbeit [32] kommen prinzipiell speziesspezifische Unterschiede des porzinen DMD-Modells und des GRMD-Modells sowie methodische Unterschiede in der quantitativ-stereologischen Analyse in Frage, die in den Abschnitten 4.4.1 und 4.4.2 diskutiert werden. Es folgen mögliche Erklärungen für die signifikant reduzierte Anzahl von somatotropen Zellen in der Adenohypophyse der DMD-Schweine (Abschnitt 4.4.3) sowie mögliche Ursachen für Wachstumsstörungen von DMD-Patienten, jenseits von strukturellen adenohypophysären Alterationen im Abschnitt 4.5.

4.4.1 Speziesspezifische Unterschiede der untersuchten Tiermodelle

Bezogen auf strukturelle adenohipophysäre Parameter (z.B. Anzahl und mittleres Volumen somatotroper Zellen in der Adenohipophyse und Volumen der GH-Granula in den einzelnen somatotropen Zellen) bei muskeldystrophen Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren, erbrachten die vorliegende Studie am porzinen DMD-Modell [32] und die Studie aus dem Jahr 2007 von de Lima *et al.* am GRMD-Modell [30] nahezu gegenteilige Ergebnisse. Die Diskrepanz könnte als Ausdruck speziesspezifischer Unterschiede der beiden verwendeten Tierarten beziehungsweise der Unterschiede in der Mutation des *DMD* Gens zwischen den beiden DMD-Modellen interpretiert werden. Trotz großer Übereinstimmungen zwischen verschiedenen Säugetierspezies im Hinblick auf ihren Zellaufbau, viele biochemische Prozesse im Organismus und auf ihre generelle Reproduktion, existieren eine Reihe von speziesspezifischen Unterschieden, die bei der Durchführung und Beurteilung von experimentellen Tierstudien berücksichtigt werden müssen [274]. Schweine werden immer häufiger als Alternative zu Hunden in der translationalen Forschung eingesetzt, wenn eine Nicht-Nagerspezies Verwendung finden soll [218,266]. Zwischen Hunden und Schweinen existieren grundsätzlich eine Reihe anatomischer und histopathologischer Unterschiede [275].

DMD-Schweine und GRMD-Hunde unterscheiden sich zusätzlich im Hinblick auf den Krankheitsverlauf und die klinischen Symptome zum Teil erheblich voneinander. Die muskeldystrophen Hunde zeigen eine starke Variabilität in der phänotypischen Ausprägung der Muskeldystrophie [213]. Einige Hunde zeigen eine ausgeprägte Bewegungseinschränkung in den ersten sechs Lebensmonaten, andere behalten die Fähigkeit zu laufen über Jahre hinweg [210,213]. Einige Muskeln, wie beispielsweise der kraniale Anteil des Schneidermuskels (*Musculus sartorius, pars cranialis*) sind stärker von Muskelnekrosen und teilweise auch stärker von Hypertrophie betroffen [210] als andere kleinkalibrige Muskelgruppen [276]. In der Histopathologie zeigt sich bei den Tieren in Abhängigkeit von der Schwere des Krankheitsverlaufs ein ähnlich variables Bild. Frühe sichtbare histopathologische Veränderungen, bei den schwer betroffenen Hunden umfassen Muskelfasernekrosen, Anzeichen von Mineralisierung und Entzündungszellinfiltration [184,209,210].

In der Studie von de Lima *et al.* wurden aufgrund dieser Variabilität, für die quantitativ-morphologische Analyse der adenohipophysären Alterationen drei Hunde mit ausgeprägten klinischen Symptomen ausgewählt und mit zwei gesunden Hunde verglichen [30].

Die DMD-Schweine zeigen im Vergleich zu humanen DMD-Patienten einen progressiven und akzelerierten Krankheitsverlauf [28,262]. Sie weisen eine deutlich eingeschränkte Mobilität und generalisierte Muskelschwäche-symptome sowie vergleichbare charakteristische histopathologische Veränderungen auf [28]. Im Vergleich zur Studie von de Lima *et al.* erfolgte daher in der vorliegenden Studie am porzinen DMD-Modell keine willkürliche Auswahl, der mit quantitativ-stereologischen Verfahren untersuchten Tiere, anhand ihrer klinischen Symptomatik [32].

Im direkten Vergleich des porzinen und des kaninen muskeldystrophen Modells, könnte zusätzlich der unterschiedliche Mutationstyp Einfluss auf die Ergebnisse haben. Die spontan auftretende *splice site* Mutation des GRMD-Modells führt zum Verlust des Exon 7 [31]. Eine hohe Variation in der Expression der alternativ gespleißten mRNA, führt bei GRMD-Hunden zu einer größeren Varianz der Translationsprodukte und könnte so eine Rolle, bei der Entwicklung der großen phänotypischen Bandbreite muskeldystropher Hunde dieses Modells spielen [208,209,277] Das porzine DMD-Modell basiert hingegen, auf der gezielten genetischen Modifikation des Exon 52, das den am häufigsten von Mutationen betroffenen Locus bei humanen DMD-Patienten darstellt [28].

Es ist daher nicht auszuschließen, dass existierende speziesspezifische und genetische Unterschiede des GRMD-Modells und des porzinen DMD-Modelles teilweise an den stark voneinander abweichenden Ergebnissen der beiden Studien beteiligt sind.

4.4.2 Methodische Unterschiede der angewandten quantitativ-stereologischen Analyseverfahren

Sowohl in der Studie von de Lima *et al.* [30] als auch in der vorliegenden Studie am porzinen DMD-Modell [32], wurden erwartungstreue quantitativ-stereologische Methoden zur Analyse von strukturellen adenohipophysären Parametern angewendet. Allerdings existieren einige fundamentale methodische Unterschiede zwischen den beiden Studien, die eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse im Hinblick auf das mittlere Volumen und die Anzahl der somatotropen Zellen in der Adenohipophyse geben könnten.

Als Voraussetzung für die quantitativ-stereologische Analyse wurde zu Beginn in beiden Studien das Volumen der Hypophyse (Referenzkompartiment) ermittelt. Das Gesamtvolumen der Hypophyse, wurde im GRMD-Modell nach dem Prinzip von Cavalieri, anhand von Flächenbestimmung der Anschnittsprofile (Prinzip von Delesse), ermittelt [225,226]. Im DMD-Modell wurde das Gesamtvolumen der frischen Hypophyse nach Bestimmung ihres Gewichts mit Hilfe ihrer spezifischen Gewebedichte ermittelt, die mit Hilfe der Submersionsmethode nach dem archimedischen Prinzip erfasst wurde [32,249].

In zahlreichen Studien wurden diese beiden Methoden zur erwartungstreuen Volumenbestimmung an der Hypophyse [278] und anderen Organen [279,280] angewendet und teilweise miteinander verglichen. Im direkten Vergleich von Submersionsmethode und dem Prinzip von Cavalieri zur Volumenbestimmung ergab sich in Abhängigkeit der jeweiligen untersuchten Organe verschiedener Spezies eine Abweichung von unter 2 beziehungsweise unter 1 % [222,253]. Bei adäquater Durchführung lassen sich somit, mit beiden Methoden zur Volumenbestimmung reproduzierbar, vergleichbare Werte ermitteln [225,249].

Der Fehlerkoeffizient der Volumenschätzung nach dem Prinzip von Cavalieri kann berechnet werden [245]. Der Fehlerkoeffizient (CE) der Volumenschätzung der Hypophyse der GRMD-Hunde betrug 0,06 und der der gesunden Hunde 0,05. Die Volumenschumpfung war bei beiden Gruppen etwa gleich (ca. 10 %) und wurde daher nicht korrigiert [30].

Der wichtigste methodische Unterschied zwischen beiden Studien besteht jedoch in der Bestimmung des mittleren Volumens und der Anzahl der somatotropen Zellen in der Adenohypophyse. Sowohl in der vorliegenden Studie [32] als auch in der Studie von de Lima *et al.* [30] wurde das physikalische Disektorverfahren [241] als stereologisches Testsystem zur erwartungstreuen Ermittlung der numerischen Volumendichte somatotroper Zellen in der Adenohypophyse angewendet.

Allerdings wurde nur in der vorliegenden Studie diese Goldstandardmethode zur erwartungstreuen Schätzung der numerischen Volumendichte adäquat in Verbindung mit einer immunhistochemischen Detektion somatotroper Zellen angewendet. Für den Einsatz des physikalischen Disektorverfahrens ist in der Regel eine Einbettung in Plastikmedien, wie beispielsweise Epon, notwendig. Sie ermöglicht, im Gegensatz zu herkömmlich eingesetzten Medien wie Paraffin, die präzise Herstellung von Semidünnschnitten in Serie mit konsistenter Schnittdicke. Auch aufgrund ihrer wesentlich geringeren Gewebeschrumpfung im Vergleich zur Paraffineinbettung, gilt die Kunststoffeinbettung als wichtige Voraussetzung für das physikalische Disektorverfahren [242,260].

Die spezifische Detektion spezieller Zellpopulationen mit Hilfe von immunhistochemischer Darstellung gestaltet sich im Kunststoffmedium jedoch deutlich schwieriger als im Paraffin und gelingt häufig nicht. Gerade in der Adenohypophyse, die sechs verschiedene endokrine Zellarten beinhaltet, ist die korrekte Identifizierung der Zielzellen jedoch unerlässlich für eine erwartungstreue Ermittlung ihrer numerischen Volumendichte mit Hilfe des physikalischen Disektorverfahrens.

In der Studie von de Lima *et al.* [30] wurde die Adenohypophyse geteilt und die somatotropen Zellen in einer Hälfte anhand von Gefrierschnitten mit Hilfe von Immunfluoreszenz dargestellt, zur quantitativ-stereologischen Untersuchung wurden jedoch Toluidinblau gefärbte Schnitte der kontralateralen Hälfte der Adenohypophyse im Disektorverfahren verwendet [30]. Zur Identifizierung der somatotropen Zellen in den Kunststoffschnitten diente das Muster der immunmarkierten somatotropen Zellen in den Gefrierschnitten, das heißt in einer anderen als der untersuchten Gewebelokalisation.

In der Studie von de Lima *et al.* [30] wurde keine immunhistochemische Darstellung der somatotropen Zellen in den Kunststoffschnitten durchgeführt, die zur Ermittlung der numerischen Volumendichte somatotroper Zellen in der Adenohypophyse mittels Disektorverfahren dienen.

Bislang existieren keine Studien zum Verteilungsmuster somatotroper Zellen in der Adenohypophyse von Hunden. Die Möglichkeit, dass keine annähernd bilateralsymmetrische Verteilung somatotroper Zellen in der Adenohypophyse von Hunden vorliegt, muss daher berücksichtigt werden.

Eine eindeutige Identifikation der somatotropen Zellen in den ausgewerteten Schnitten ist daher eine unabdingbare Voraussetzung für die erwartungstreue Schätzung somatotroper Zellen in der Adenohypophyse mit Hilfe des Disektorverfahrens. Die Differenzierung von somatotropen Zellen in der Adenohypophyse gelingt nur mit einer spezifischen immunhistochemischen Darstellung.

Die von de Lima *et al.* [30] angewendete Toluidinblaufärbung färbt den Zellkern und die Granula endokriner Zellen im Zytoplasma von Kunststoffschnitten blau an, allerdings ist eine hinreichend sichere Abgrenzung somatotroper Zellen zu den anderen in der Adenohypophyse vorkommenden endokrinen Zellpopulationen (laktotrope, thyreotrope, kortikotrope, und gonadotrope Zellen) für den Untersucher schwierig [70]. Vor dem Hintergrund der nicht erfolgten Differenzierung, der zu analysierenden somatotropen Zellen, ist eine erwartungstreue Schätzung der numerischen Volumendichte, die ausschließlich somatotrope Zellen in der Adenohypophyse berücksichtigen soll, in der Studie von de Lima *et al.* [30] zumindest zweifelhaft.

In der Studie am porzinen DMD-Modell wurde hingegen ein immunhistochemisches Protokoll etabliert, dass die Detektion von GH-positiven Zellen in Epon-Semidünnschnitten ermöglicht [32]. Dies gewährleistete eine eindeutige Identifizierung der somatotropen Zellen in Kunststoffschnitten. Auf diese Weise war es möglich die beiden zwingenden Voraussetzungen (Kunststoffeinbettung und eindeutige Differenzierung der somatotropen Zellen) zur erwartungstreuen Schätzung der numerischen Volumendichte somatotroper Zellen in der Adenohypophyse mit Hilfe des Disektorverfahrens, für die quantitativ-stereologischen Analyse der Adenohypophyse im porzinen DMD-Modell, zu erfüllen [32].

Abschließend enthält die Publikation von de Lima *et al.* [30] keine Hinweise auf eine Überprüfung der nominellen Schnittdicke, der im physikalischen Disektorverfahren untersuchten Kunststoffschritte. In der Studie am porzinen DMD-Modell wurden hingegen, die Schnittdicken, der hergestellten Semidünnschnitte, durch spektral reflektometrische Messungen überprüft. Die Ergebnisse flossen bei der Berechnung des jeweiligen Disektorvolumens ein. Die Feststellung der tatsächlichen Schnittdicke ist für das physikalische Disektorverfahren essenziell, da sie das ausgewertete Disektorvolumen über die Höhe des Disektors maßgeblich mitbestimmt [260].

Die dargestellten methodischen und technischen Unterschiede können daher in besonderem Maße für die Erklärung unterschiedlicher Ergebnisse der beiden Studien in Betracht gezogen werden.

4.4.3 Mögliche Ursachen für eine verringerte absolute Anzahl somatotroper Zellen in der Adenohypophyse von DMD-Schweinen

Die somatotropen Zellen der DMD-Schweine wiesen im Vergleich zu Kontrolltieren ein reguläres histomorphologisches und ultrastrukturelles Erscheinungsbild auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene auf. Die quantitativ-stereologische Analyse ergab zudem keinen Hinweis auf Abweichungen hinsichtlich des mittleren Zellvolumens der somatotropen Zellen in der Adenohypophyse und bezüglich des Volumens der intrazellulären GH-Granula in den einzelnen somatotropen Zellen. Lediglich die Gesamtzahl der somatotropen Zellen in der Adenohypophyse war bei DMD-Schweinen gegenüber Kontrolltieren signifikant um die Hälfte reduziert. Die reduzierte absolute Anzahl der somatotropen Zellen in der Adenohypophyse ging bei allen betroffenen DMD-Schweinen mit einer Reduktion des adenohypophysären Volumens und einem entsprechend reduzierten Körpergewicht einher. Die Anzahl der somatotropen Zellen in der Adenohypophyse, zeigte in beiden Gruppen (DMD- und Kontrolltiere) eine signifikant positive Korrelation mit dem jeweiligen Körpergewicht, Gehirngewicht und Hypophysengewicht der untersuchten Tiere. Studien in verschiedenen Tierspezies geben Hinweise auf eine lokale, alters- beziehungsweise wachstumsabhängige Zunahme der Anzahl GH-produzierender Zellen bei Schweinen [83], Ratten [281] und Mäusen [282]. In einer quantitativ-stereologischen Untersuchung konnten Trifunovic *et al.* [283] bei Ratten 2018 nach wiederholter Immobilisation und Fixierung eine möglicherweise stressbedingte Reduktion der Anzahl somatotroper Zellen feststellen [283]. Eine stressbedingte Abnahme der somatotropen Zellzahl könnte in Folge der eingeschränkten Mobilität der muskeldystrophen Schweine im fortgeschrittenen Krankheitsstadium eine Rolle spielen, ohne gravierende Auswirkungen auf das Wachstum zu haben (siehe Abschnitt 4.5).

4.5 Erklärungsansätze für Wachstumsstörungen bei humanen DMD-Patienten jenseits einer strukturellen Veränderung der Adenohypophyse

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie am porzinen DMD-Modell sprechen im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem GRMD-Modell nicht für eine gestörte Wachstumshormonsekretion bei DMD-Schweinen. Es gab keinen Hinweis auf morphologische oder funktionelle Alterationen von somatotropen Zellen innerhalb der Adenohypophyse, die ursächlich für ein reduziertes Wachstum von DMD-Tieren sein könnten [32].

Die Variation Geburtsgewichte der DMD-Schweine sind ein bekanntes Phänomen, bei der Generierung von genetisch modifizierten Tiermodellen mit Hilfe von SCNT [28,265]. Die DMD-Schweine wiesen im Alter von drei Monaten gegenüber gleichaltrigen Kontrolltieren ein signifikant um die Hälfte reduziertes Körpergewicht auf. Bei humanen DMD-Patienten stellen eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit und Kleinwüchsigkeit regelmäßig beobachtete Phänomene der Erkrankung dar, die bis zu 30 % der Patienten betreffen [12,14]. DMD-Patienten liegen durchweg signifikant unterhalb der Wachstumskurven von gesunden Gleichaltrigen [15]. Im Durchschnitt sind DMD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kindern im Alter von zwei bis zwölf Jahren rund 4,3 cm kleiner [15,24]. Der Anteil steroidnaiver DMD-Patienten, die unter die 3. Perzentile fallen und somit als kleinwüchsig gelten, lag bei steroidnaiven Kindern in einer retrospektiven Studie aus dem Jahr 2017 von Wong *et al.* [180] bei 10 %. In einer Studie aus dem Jahr 2014 von Sarrazin *et al.* [14], die 263 zwei bis fünf Jährige, überwiegend steroidnaive DMD-Patienten einschloss, lag der Anteil der kleinwüchsigen DMD-Patienten bei 30 % [14].

Das im Vergleich zu humanen DMD Patienten deutlich reduzierte Wachstum der DMD-Schweine könnte sich ähnlich, wie bei jungen GRMD-Hunden, aufgrund einer ausgeprägten katabolen Stoffwechselsituation, die durch anhaltende schwere Muskelnekrose und Regenerationsprozesse entsteht, entwickeln [184]. Eine reduzierte Mobilität der muskeldystrophen Schweine und eine damit verbundene geringe mechanische Stimulation der langen Röhrenknochen könnte sich, ähnlich wie bei mdx Mäusen, ungünstig auf das Wachstum auswirken [186].

Abgesehen von hypophysären Alterationen könnte das GH/IGF1-System eine essenzielle Beteiligung an der Pathogenese des verzögerten Wachstums von DMD-Schweinen aufweisen. Hierfür käme unter anderem eine lokal verringerte Wirksamkeit von GH/IGF1 am dystrophen Muskel in Betracht. Zahlreiche Studien weisen außerdem darauf hin, dass die GH-abhängigen endokrin wirksamen IGF1-Effekte im Muskel von nachrangiger Bedeutung sind im Vergleich zu den lokalen auto- und parakinen IGF1-Effekten [131,132,284].

In einer Studie aus dem Jahr 2013 von Vijayakumar *et al.* [131] konnte an muskelspezifisch *GHR*-defizienten Mäusen keine signifikante Veränderung auf histopathologischer Ebene gegenüber Kontrolltieren festgestellt werden. Die Ergebnisse lieferten einen Hinweis darauf, dass die GHR-Signaltransduktionskaskade bei adulten Mäusen keinen signifikanten Einfluss auf die Regulation der Muskelmasse und der Regenerationsprozesse im Muskel hat. IGF1 scheint jedoch wesentlich an der Fusion von Muskelfasern beteiligt zu sein und seine Expression ist in diesem Modell nicht abhängig von der GHR-Signaltransduktionskaskade, die im Anschluss an die Bindung von GH ausgelöst wird [131]. Barton *et al.* konnten 2002 bei IGF1-transgenen *mdx* Mäusen zeigen, dass eine Überexpression von muskelspezifischem IGF1 in der Lage war die Muskelmasse zu erhöhen und die Regenerationsprozesse im Muskel zu beschleunigen [284].

Im dystrophen Muskel von humanen DMD-Patienten und DMD-Schweinen kommt es zum vermehrten Auftreten von Faserdegeneration und Fasernekrosen, die im Zusammenspiel mit einem lokalen Entzündungsgeschehen die lokale Wirkung von GH und IGF1 beeinträchtigen könnten. Eine entzündungsinduzierte GH-Resistenz, spielt beispielsweise bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle unter anderem durch den Einfluss von Entzündungsfaktoren auf intrazelluläre GH-vermittelte Signaltransduktionskaskaden [49].

Eine verringerte Anzahl von Muskelzellen, deren Membran eine intakte Expression von GH- und IGF1-Rezeptoren aufweist, könnte ebenfalls bei den DMD-Tieren die Wirkung von lokalen GH- und IGF1-Effekten am Muskel beeinträchtigen. Neben einer geringeren Abundanz des IGF1R könnten auch eingeschränkte vesikuläre Transportmechanismen im dystrophen Muskel für eine verringerte Sensitivität gegenüber IGF1 sorgen. In einem Dysferlin

defizienten Mausmodell für die menschliche Gliedergürteldystrophie konnten Demonbreun *et al.* im Jahr 2011 [285] eine Insensitivität der Muskelfasern gegenüber IGF1 im Vergleich zu Kontrolltieren feststellen. Der Mangel an funktionstüchtigem Membranprotein Dysferlin, führt zu einer Muskeldystrophie mit histopathologischen Veränderungen, die teilweise denen von mdx-Mäusen ähneln, hierzu zählen beispielsweise ausgeprägte Variationen im Muskelfaserdurchmesser und Muskelfasern mit zentralständigen Zellkernen [285]. Die isolierten Myoblasten von Dysferlin-defizienten Mäusen beinhalteten im Vergleich zu den Myoblasten von Kontrolltieren eine erhöhte Anzahl an Vesikeln mit dem lysosomalen Membranprotein 2 (*Lysosome-associated membrane protein, LAMP2*), die gemeinsam mit immunmarkierten Aggregaten des IGF1R in der Nähe des Zellkerns auftraten. Demonbreun *et al.* [285] konnten so zeigen, dass Dysferlin möglicherweise eine wichtige Rolle bei Transport- und Recycling-Prozessen des IGF1R spielt, da Hinweise auf eine Fehllokalisierung des IGF1R und eine Aggregatbildung innerhalb der Lysosomen von Dysferlin-defizienten Mäusen auf einen gestörten Abbau und Recyclingprozess des IGF1R in den Lysosomen hindeuteten [285].

Veränderungen im Sekretionsmuster und eine Dysregulation von vesikulären Transportmechanismen wurden auch bei isolierten Myotuben von mdx Mäusen beobachtet [286]. In der Proteomanalyse traten bei den Myotuben der mdx Mäuse im Vergleich zu Myotuben von Kontrolltieren die lysosomalen Membranproteine 1 und 2 (LAMP1 und LAMP2) auffällig hervor.

Die Abhängigkeit dieser Veränderungen von der Dystrophin-Defizienz konnte durch eine Normalisierung des Sekretionsmusters und die Reduktion der vesikulären Markerproteine (LAMP1 und LAMP2) im Anschluss an die Wiederherstellung der Dystrophinexpression mit Hilfe von *exon skipping in vitro*, gezeigt werden [286]. Vergleichbare Prozesse, die an einer Insensitivität des dystrophen Muskels gegenüber IGF1 beteiligt sein könnten, können bei DMD-Schweinen ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Die DMD-Schweine wiesen am 2. Lebenstag gegenüber gleichaltrigen Kontrolltieren eine reduzierte Expression der *IGF1 mRNA* im Muskel auf [28]. Das porcine DMD-Modell bietet sich daher für eine zusätzliche eingehende Charakterisierung hinsichtlich der Abundanz von IGF1 und des IGF1R auf Proteinebene an.

4.6 Ausblick

Die Befunde der vorliegenden Studie ergaben keinen Hinweis auf eine Beeinträchtigung der GH-Sekretion von DMD-Schweinen. Es konnten keine strukturellen und funktionellen adenohipophysären Veränderungen festgestellt werden, die als Ursache für ein reduziertes Wachstum von DMD-Tieren interpretiert werden könnten [32]. Die Möglichkeit einer Beteiligung des GH/IGF1-Systems am verzögerten Wachstum muskeldystropher Tiere, in Form einer lokal eingeschränkten Wirkung einzelner Wachstumsfaktoren am dystrophen Muskel, muss jedoch in Betracht gezogen werden. Eigene, nicht veröffentlichte immunhistochemische Untersuchungen des IGF1R in Skelettmuskelproben von DMD- und Kontrolltieren, weisen auf die Abundanz des IGF1R in beiden Gruppen hin, die möglicherweise im dystrophen Muskel geringer ausgeprägt sein könnte.

Analog zur Quantifizierung von adenohipophysären Parametern im DMD-Modell, können die im Rahmen dieser Arbeit etablierten quantitativ-stereologischen Verfahren zur Charakterisierung der porzinen Adenohipophyse in weiteren translationalen Studien angewendet werden. Auf diese Weise können zum Beispiel wertvolle Einblicke in das Zusammenspiel des GH/IGF1-Systems von GHR-defizienten Schweinen [110] gewonnen werden. Ein Verfahren zur verbesserten Anwendbarkeit der Disektor-Analyse in einer Kombination mit immunhistochemischer Detektion verschiedener endokriner Zellarten in der porzinen Adenohipophyse befindet sich derzeit in der Erprobung. Hierfür soll die Einsatzmöglichkeit des physikalischen Disektorverfahrens auf Paraffinschnitte ausgeweitet werden indem mittels Koeinbettung eines Referenzkunststoffes eine exakte spektral reflektometrische Schnittdickenbestimmung erfolgen soll.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Bei bis zu 30 % der Patienten mit Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) tritt, neben der progressiven Muskelschwäche, auch ein vermindertes Wachstum bis hin zur Kleinwüchsigkeit auf. Neben anderen möglichen Ursachen konnte eine Beteiligung des Wachstumshormon (GH)/Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGF1)-Systems bislang nicht sicher ausgeschlossen werden und wurde über Jahrzehnte kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurden quantitativ-stereologische Untersuchungen der Hypophyse an einem genetisch modifizierten, translationalen porzinen DMD-Großtiermodell durchgeführt, welches etliche charakteristische, histopathologische Veränderungen und die progressive klinische Symptomatik der humanen Muskeldystrophie adäquat widerspiegelt.

Zur Klärung einer möglichen Beteiligung des hypophysären GH/IGF1-Systems an der Pathogenese von Wachstumsstörungen von DMD-Schweinen wurden die Hypophysen von sechs DMD-Tieren und fünf gesunden, männlichen Kontrolltieren im Alter von drei Monaten auf struktureller, ultrastruktureller und funktioneller Ebene untersucht. Die strukturellen Parameter, die zur quantitativ-stereologischen Analyse herangezogen wurden, umfassten die Volumina der Hypophyse, der Adenohypophyse und der somatotropen Zellen, die Anzahl und das mittlere Volumen der somatotropen Zellen sowie das Volumen ihrer intrazellulär enthaltenen GH-Granula. Die erwartungstreue Schätzung der quantitativ-stereologischen hypophysären Parameter erfolgte mit Hilfe von modellunabhängigen, stereologischen Methoden und nach einem strikten, systematisch-zufälligen Probennahmeverfahren. Als funktionelles Pendant wurde die Abundanz von GH in der Adenohypophyse mittels Western Blot-Verfahren sowie die Konzentrationen von GH und IGF1 im Serum der DMD- und Kontrolltiere, mit Hilfe eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA), bestimmt. Die Ergebnisse der Studie wurden 2020 in der Fachzeitschrift *Growth Hormone & IGF Research* publiziert.

Die wichtigsten Befunde von DMD-Schweinen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren waren:

- i. Eine signifikante Reduktion des Volumens der Hypophyse um ~35 % und des Volumens der somatotropen Zellen in der Adenohypophyse um ~50 %.
- ii. Eine signifikante Reduktion der Anzahl somatotroper Zellen in der Adenohypophyse um ~50 %.
- iii. Kein signifikanter Unterschied im mittleren Volumen der somatotropen Zellen und im Volumen der intrazellulären GH-Granula in somatotropen Zellen.
- iv. Kein signifikanter Unterschied der Abundanz von GH in der Adenohypophyse sowie in den Serumkonzentrationen von GH und IGF1.

Die Anzahl somatotroper Zellen in der Adenohypophyse zeigte eine positive Korrelation mit dem Hypophysen- und Körpergewicht von leichteren DMD- und schwereren Kontrolltieren. Das reguläre histomorphologische und ultrastrukturelle Erscheinungsbild der somatotropen Zellen und die unveränderte Abundanz von GH sprechen dafür, dass im porzinen Modell keine gestörte Produktion oder Freisetzung von GH am verzögerten Wachstum muskeldystropher Schweine beteiligt zu sein scheint.

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Befunden einer quantitativ-stereologischen Untersuchung der Hypophyse im muskeldystrophen Golden Retriever-Modell (GRMD) von de Lima *et al.* aus dem Jahr 2007 [30]. In dieser Studie wurde bei muskeldystrophen Hunden ein erhöhtes mittleres Volumen der somatotropen Zellen und ein erhöhtes Volumen ihrer intrazellulären GH-Granula zusammen mit signifikant erniedrigten Serum-IGF1-Konzentrationen festgestellt. Aufgrund dieser Befunde wurde eine gestörte Wachstumshormonsekretion in Zusammenhang mit dem krankheitsbedingten Dystrophinmangel angenommen [30]. Die Diskrepanz der beiden Studienergebnisse kann durch speziesspezifische Unterschiede und methodische Divergenzen erklärt werden. Im Gegensatz zum GRMD-Modell gelang im porzinen Modell die eindeutige immunhistochemische Darstellung somatotroper Zellen in den Kunststoffschnitten, die zur Ermittlung der numerischen Volumendichte dieser Zellen in der Adenohypophyse mit Hilfe des physikalischen Disektorverfahrens dienten.

Dieser methodische Unterschied spielt eine wesentliche Rolle, da nur die eindeutige Identifizierung der Zielzellen und deren Abgrenzung zu anderen endokrinen Zellen eine erwartungstreue Schätzung ihrer numerischen Volumendichte ermöglicht.

Umfassende quantitativ-stereologische Untersuchungen der Hypophysen humaner DMD-Patienten zum Vergleich fehlen bislang. Im porzinen DMD-Modell könnten, nach dem Ausschluss einer ursächlichen Beteiligung von strukturellen Alterationen der Hypophyse am reduzierten Wachstum, auch lokal eingeschränkte GH- und IGF1-Aktivitäten an degenerierten und nekrotischen Muskelfasern in Betracht gezogen werden. Die Ergebnisse der quantitativ-stereologischen Untersuchungen der Adenohypophyse tragen wesentlich zur eingehenden Charakterisierung des porzinen DMD-Modells bei. Darüber hinaus wird die Anwendung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Untersuchungstechniken einen wertvollen Beitrag zur quantitativ-stereologischen Untersuchung der Hypophysenmorphologie in weiteren Studien an translationalen Modellen beziehungsweise bei der Untersuchung humaner Gewebeproben leisten können.

6 SUMMARY

Besides the progressive muscle weakness, short stature is a frequently observed feature in up to 30% of DMD patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD). Among other possible causes, an involvement of the growth hormone (GH)/insulin-like growth factor 1 (IGF1) system could not be excluded with certainty and has been controversially discussed for decades. In the present study, quantitative-stereological investigations of the pituitary gland were performed on a genetically modified, translational, DMD large animal model, which adequately reflects several characteristic histopathological changes and the progressive clinical symptoms of human muscular dystrophy.

To clarify a potential role of the pituitary GH/IGF1 system in the pathogenesis of growth disorders in DMD pigs, the pituitary glands of six DMD animals and five healthy, 3 months old, male control animals, were examined at structural, ultrastructural, and functional levels. The structural parameters used for quantitative stereological analysis included the volumes of pituitary glands, adenohypophysis and somatotroph cells, the number and the mean cellular volume of somatotroph cells and the volume of their intracellular GH-granules. The abundance of GH in the adenohypophysis was determined by Western blot techniques and the serum levels of GH and IGF1 of DMD and control animals were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) techniques. The estimation of the quantitative stereological parameters was performed using design-based stereological methods and was carried out according to a strict, systematic uniform random sampling (SURS) procedure. The results of the study were published in the journal *Growth Hormone & IGF Research* in 2020 [32].

The key findings of DMD pigs compared to healthy control animals were

- i. A significant reduction of the pituitary gland volume by ~35% and of the volume of somatotroph cells in the adenohypophysis by ~50%.
- ii. A significant reduction of somatotroph cell number in the adenohypophysis by ~50%.
- iii. No significant difference in the mean cellular volume of somatotroph cells and the volume of intracellular GH-granules in somatotroph cells.
- iv. No significant difference in the abundance of GH in the adenohypophysis and in serum concentrations of GH and IGF1.

The number of somatotroph cells in the adenohypophysis showed a positive correlation with body- and pituitary weight in DMD pigs with less weight and heavier control animals. The regular histomorphological and ultrastructural appearance of somatotroph cells and the unchanged abundance of GH indicate that in the porcine model no disturbed production or release of GH seems to be involved in the reduced growth of DMD pigs.

These results contrast with the findings of a quantitative stereological study of the pituitary gland in a dystrophic golden retriever model (GRMD) by de Lima *et al.* in 2007 [30]. GRMD dogs displayed an increased mean cellular volume of somatotroph cells and an increased volume of intracellular GH-granules in somatotroph cells together with a significantly decreased serum level of IGF1. Based on these findings, an impaired growth hormone secretion was assumed to be associated with the disease-related dystrophin deficiency [30].

The discrepancy between the results of both studies can be explained by species specific differences and methodological divergences. In contrast to the GRMD model, in the porcine DMD model, unambiguous immunohistochemical labeling of somatotroph cells in plastic-resin-embedded sections was performed. Subsequently, these sections were used to determine the numerical volume density of somatotroph cells in the adenohypophysis by physical disector analysis.

This methodological difference plays an essential role, since only the unambiguous identification of the target cells and their differentiation from other endocrine cells allows for an unbiased estimation of their numerical volume density.

So far, there are no comparable quantitative stereological studies of the pituitary glands of human DMD patients. Locally impaired GH and IGF1 activities in degenerated and necrotic muscle fibers could also be considered as a likely cause of reduced growth, since structural alterations of the pituitary gland in DMD pigs could be excluded in the present study. The results of the quantitative stereological investigations of the adenohypophysis contribute significantly to the characterization of the porcine DMD model. In addition, the application of the techniques established in the present study will make a valuable contribution to the quantitative stereological investigation of the pituitary morphology in further studies on translational animal models or in the analysis of human tissue samples.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der somatotropen Achse.....9
[Quelle: Isabel Hofmann, 2020]
- Abbildung 2: Hypophyse eines Schweines in *situ*..... 11
[Quelle: Isabel Hofmann, 2020]
- Abbildung 3: Histologie der Hypophyse 12
[Quelle: Isabel Hofmann, 2020]
- Abbildung 4: Zellen der Adenohypophyse 13
[Quelle: Isabel Hofmann, 2020]
- Abbildung 5: Schematische Abbildung des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes (DGC) in der Muskelfasermembran28
[Quelle: Jones, 2019 [157]
- Abbildung 6: Quantifizierbare morphologische Parameter, stereologische Testsysteme, Stichprobennahmeverfahren und Randomisierung der Proben/Schnittausrichtung in modellunabhängigen, erwartungstreuen quantitativ-stereologischen Analysen.....54
[Quelle: Dr. A. Parzefall, Helmholtz Zentrum München, 2020]

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. E. P. Hoffman, R. H. Brown, Jr., L. M. Kunkel (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51(6):919–928.
2. D. Bradley, E. Parsons (1998). Newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Seminars in Neonatology*, 3(1):27–34.
3. A. E. Emery (1991). Population frequencies of inherited neuromuscular diseases-a world survey. *Neuromuscular disorders*, 1(1):19–29.
4. D. J. Blake, A. Weir, S. E. Newey, K. E. Davies (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological reviews*, 82(2):291–329.
5. K. Bushby, R. Finkel, D. J. Birnkrant, L. E. Case, P. R. Clemens, L. Cripe, A. Kaul, K. Kinnett, C. McDonald, S. Pandya, J. Poysky, F. Shapiro, J. Tomezsko, C. Constantin (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet Neurology*, 9(1):77–93.
6. P. B. Shieh (2018). Emerging strategies in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Neurotherapeutics*, 15(4):840–848.
7. A. Moretti, L. Fonteyne, F. Giesert, P. Hoppmann, A. B. Meier, T. Bozoglu, A. Baehr, C. M. Schneider, D. Sinnecker, K. Klett, T. Fröhlich, F. A. Rahman, T. Haufe, S. Sun, V. Jurisch, B. Kessler, R. Hinkel, R. Dirschinger, E. Martens, C. Jilek, A. Graf, S. Krebs, G. Santamaria, M. Kurome, V. Zakhartchenko, B. Campbell, K. Voelse, A. Wolf, T. Ziegler, S. Reichert, S. Lee, F. Flenkenthaler, T. Dorn, I. Jeremias, H. Blum, A. Dendorfer, A. Schnieke, S. Krause, M. C. Walter, N. Klymiuk, K. L. Laugwitz, E. Wolf, W. Wurst, C. Kupatt (2020). Somatic gene editing ameliorates skeletal and cardiac muscle failure in pig and human models of Duchenne muscular dystrophy. *Nature medicine*, 26(2):207–214.

8. L. Peverelli, S. Testolin, L. Villa, A. D'Amico, S. Petrini, C. Favero, F. Magri, L. Morandi, M. Mora, T. Mongini, E. Bertini, M. Sciacco, G. P. Comi, M. Moggio (2015). Histologic muscular history in steroid-treated and untreated patients with Duchenne dystrophy. *Neurology*, 85(21):1886–1893.
9. R. C. Griggs, J. P. Miller, C. R. Greenberg, D. L. Fehlings, A. Pestronk, J. R. Mendell, R. T. Moxley, W. King, J. T. Kissel, V. Cwik, M. Vanasse, J. M. Florence, S. Pandya, J. S. Dubow, J. M. Meyer (2016). Efficacy and safety of deflazacort vs prednisone and placebo for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, 87(20):2123–2131.
10. S. Miyatake, Y. Shimizu-Motohashi, S. Takeda, Y. Aoki (2016). Anti-inflammatory drugs for Duchenne muscular dystrophy: focus on skeletal muscle-releasing factors. *Drug design, development and therapy*, 10:2745–2758.
11. L. M. Ward, D. R. Weber (2019). Growth, pubertal development, and skeletal health in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 26(1):39–48.
12. M. Matsumoto, H. Awano, T. Lee, Y. Takeshima, M. Matsuo, K. Iijima (2017). Patients with Duchenne muscular dystrophy are significantly shorter than those with Becker muscular dystrophy, with the higher incidence of short stature in Dp71 mutated subgroup. *Neuromuscular disorders*, 27(11):1023–1028.
13. B. H. Nagel, W. Mortier, M. Elmlinger, H. A. Wollmann, K. Schmitt, M. B. Ranke (1999). Short stature in Duchenne muscular dystrophy: a study of 34 patients. *Acta paediatrica*, 88(1):62–65.
14. E. Sarrazin, M. von der Hagen, U. Schara, K. von Au, A. M. Kaindl (2014). Growth and psychomotor development of patients with Duchenne muscular dystrophy. *European journal of paediatric neurology*, 18(1):38–44.

15. N. A. West, M. L. Yang, D. A. Weitzenkamp, J. Andrews, F. J. Meaney, J. Oleszek, L. A. Miller, D. Matthews, C. DiGuseppi (2013). Patterns of growth in ambulatory males with Duchenne muscular dystrophy. *The Journal of pediatrics*, 163(6):1759-1763.
16. C. L. Wood, V. Straub, M. Guglieri, K. Bushby, T. Cheetham (2016). Short stature and pubertal delay in Duchenne muscular dystrophy. *Archives of disease in childhood*, 101(1):101–106.
17. R. Rapisarda, F. Muntoni, P. Gobbi, V. Dubowitz (1995). Duchenne muscular dystrophy presenting with failure to thrive. *Archives of disease in childhood*, 72(5):437–438.
18. M. Zatz, M. Vainzof, D. Rapaport, J. M. da Rocha, R. d. C. Pavanello, R. T. Betti (1987). Mazindol and growth hormone inhibition in Duchenne muscular dystrophy. *American journal of medical genetics*, 27(4):993–995.
19. M. Zatz, R. T. Betti (1986). Benign Duchenne muscular dystrophy in a patient with growth hormone deficiency: a five years follow-up. *American journal of medical genetics*, 24(3):567–572.
20. P. J. Collipp, J. Kelemen, S. Y. Chen, M. Castro-Magana, M. Angulo, A. Derenoncourt (1984). Growth hormone inhibition causes increased selenium levels in Duchenne muscular dystrophy: a possible new approach to therapy. *Journal of medical genetics*, 21(4):254–256.
21. M. Bodor, C. M. McDonald (2013). Why short stature is beneficial in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle & nerve*, 48(3):336–342.
22. M. Zatz, R. T. Betti, J. A. Levy (1981). Benign Duchenne muscular dystrophy in a patient with growth hormone deficiency. *American journal of medical genetics*, 10(3):301–304.
23. M. M. Rutter, J. Collins, S. R. Rose, J. G. Woo, H. Sucharew, H. Sawnani, K. N. Hor, L. H. Cripe, B. L. Wong (2012). Growth hormone treatment in boys with Duchenne muscular dystrophy and glucocorticoid-induced growth failure. *Neuromuscular disorders*, 22(12):1046–1056.

24. D. R. Weber, S. Hadjiyannakis, H. J. McMillan, G. Noritz, L. M. Ward (2018). Obesity and endocrine management of the patient with Duchenne muscular dystrophy. *Pediatrics*, 142(Suppl 2):43-52.
25. A. Cittadini, L. Ines Comi, S. Longobardi, V. Rocco Petretta, C. Casaburi, L. Passamano, B. Merola, E. Durante-Mangoni, L. Sacca, L. Politano (2003). A preliminary randomized study of growth hormone administration in Becker and Duchenne muscular dystrophies. *European heart journal*, 24(7):664–672.
26. D. J. Wells (2018). Tracking progress: an update on animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Disease models & mechanisms*, 11(6):dmm035774.
27. A. Nakamura, S. Takeda (2011). Mammalian models of Duchenne muscular dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011:184393.
28. N. Klymiuk, A. Blutke, A. Graf, S. Krause, K. Burkhardt, A. Wuensch, S. Krebs, B. Kessler, V. Zakhartchenko, M. Kurome, E. Kemter, H. Nagashima, B. Schoser, N. Herbach, H. Blum, R. Wanke, A. Aartsma-Rus, C. Thirion, H. Lochmuller, M. C. Walter, E. Wolf (2013). Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Human molecular genetics*, 22(21):4368–4382.
29. J. T. Selsby, J. W. Ross, D. Nonneman, K. Hollinger (2015). Porcine models of muscular dystrophy. *Institute for laboratory animal research (ILAR) journal*, 56(1):116–126.
30. A. R. de Lima, J. R. Nyengaard, A. A. Jorge, J. C. Balieiro, C. Peixoto, E. T. Fioretto, C. E. Ambrosio, M. A. Miglino, M. Zatz, A. A. Ribeiro (2007). Muscular dystrophy-related quantitative and chemical changes in adenohipophysis GH-cells in golden retrievers. *Growth hormone & IGF research*, 17(6):480–491.

31. N. J. Sharp, J. N. Kornegay, S. D. van Camp, M. H. Herbstreith, S. L. Secore, S. Kettle, W. Y. Hung, C. D. Constantinou, M. J. Dykstra, A. D. Roses, et al. (1992). An error in dystrophin mRNA processing in Golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics*, 13(1):115–121.
32. I. Hofmann, E. Kemter, N. Theobalt, S. Fiedler, M. Bidlingmaier, A. Hinrichs, M. Aichler, K. Burkhardt, N. Klymiuk, E. Wolf, R. Wanke, A. Blutke (2020). Linkage between growth retardation and pituitary cell morphology in a dystrophin-deficient pig model of Duchenne muscular dystrophy. *Growth hormone & IGF research*, 51:6–16.
33. A. Giustina, J. D. Veldhuis (1998). Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocrine reviews*, 19(6):717–797.
34. D. Le Roith, L. Scavo, A. Butler (2001). What is the role of circulating IGF-I? *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 12(2):48–52.
35. J. Devesa, C. Almenglo, P. Devesa (2016). Multiple effects of growth hormone in the body: is it really the hormone for growth? *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes*, 9:47–71.
36. A. A. Butler, D. Le Roith (2001). Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annual review of physiology*, 63:141–164.
37. A. Blutke, M. R. Schneider, I. Renner-Muller, N. Herbach, R. Wanke, E. Wolf (2014). Genetic dissection of IGF1-dependent and -independent effects of permanent GH excess on postnatal growth and organ pathology of mice. *Molecular and cellular endocrinology*, 394(1-2):88–98.
38. E. R. Froesch, C. Schmid, J. Schwander, J. Zapf (1985). Actions of insulin-like growth factors. *Annual review of physiology*, 47:443–467.

39. E. Stratikopoulos, M. Szabolcs, I. Dragatsis, A. Klinakis, A. Efstratiadis (2008). The hormonal action of IGF1 in postnatal mouse growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49):19378–19383.
40. K. Sjögren, J. L. Liu, K. Blad, S. Skrtic, O. Vidal, V. Wallenius, D. Le Roith, J. Törnell, O. G. Isaksson, J. O. Jansson, C. Ohlsson (1999). Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12):7088–7092.
41. S. Yakar, J. L. Liu, B. Stannard, A. Butler, D. Accili, B. Sauer, D. Le Roith (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(13):7324–7329.
42. J. D. Veldhuis, C. Y. Bowers (2003). Human GH pulsatility: an ensemble property regulated by age and gender. *Journal of endocrinological investigation*, 26(9):799–813.
43. G. Brandenberger, L. Weibel (2004). The 24-h growth hormone rhythm in men: sleep and circadian influences questioned. *Journal of sleep research*, 13(3):251–255.
44. F. J. Steyn, V. Tolle, C. Chen, J. Epelbaum (2016). Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion. *Comprehensive Physiology*, 6(2):687–735.
45. M. S. Lewitt (2017). The role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in visceral adiposity. *Biochemistry insights*, 10:1178626417703995.
46. J. I. Jones, D. R. Clemmons (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocrine reviews*, 16(1):3–34.
47. M. B. Ranke, J. M. Wit (2018). Growth hormone - past, present and future. *Nature reviews. Endocrinology*, 14(5):285–300.

48. E. Wolf, E. Kahnt, J. Ehrlein, W. Hermanns, G. Brem, R. Wanke (1993). Effects of long-term elevated serum levels of growth hormone on life expectancy of mice: lessons from transgenic animal models. *Mechanisms of ageing and development*, 68(1-3):71–87.
49. C. Soendergaard, J. A. Young, J. J. Kopchick (2017). Growth hormone resistance-special focus on inflammatory bowel disease. *International journal of molecular sciences*, 18(5):1019.
50. V. Cingel-Ristic, A. Flyvbjerg, S. L. Drop (2004). The physiological and pathophysiological roles of the GH/IGF-axis in the kidney: lessons from experimental rodent models. *Growth hormone & IGF research*, 14(6):418–430.
51. A. Blutke, M. R. Schneider, E. Wolf, R. Wanke (2016). Growth hormone (GH)-transgenic insulin-like growth factor 1 (IGF1)-deficient mice allow dissociation of excess GH and IGF1 effects on glomerular and tubular growth. *Physiological reports*, 4(5):1–18.
52. R. Wanke, E. Wolf, G. Brem, W. Hermanns (2001). Zur Bedeutung der Podozytenschädigung in der Pathogenese glomerulosklerotischer und tubulointerstitieller Läsionen: Am Modell der progressiven Nephropathie der Wachstumshormon-transgenen Maus erhobene Befunde. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 85:250–256.
53. R. Nickel, A. Schummer, E. Seiferle, G. Böhme (2004). Nervensystem, Sinnesorgane, endokrine Drüsen. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. 4. unveränderte Auflage, R. Nickel, A. Schummer, E. Seiferle, G. Böhme (eds.), Parey, Stuttgart.
54. A. Giustina, G. Mazziotti, E. Canalis (2008). Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocrine reviews*, 29(5):535–559.
55. Y. Kato, Y. Murakami, M. Sohmiya, M. Nishiki (2002). Regulation of human growth hormone secretion and its disorders. *Internal medicine*, 41(1):7–13.

56. V. Cingel-Ristić (2004). The GH/IGF axis in the mouse kidney. Dissertation, Erasmus University Rotterdam.
57. U. Weiler (1996). Wachstum und Wachstumsregulation beim Schwein. Habilitationsschrift, Universität Hohenheim.
58. L. A. Frohman (2009). Growth hormone. In: Encyclopedia of neuroscience, 1st edition, L. R. Squire (ed.), Academic Press, London, 993–998.
59. H. Watanobe, S. Habu (2002). Leptin regulates growth hormone-releasing factor, somatostatin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone but not neuropeptide Y release in rat hypothalamus in vivo: relation with growth hormone secretion. *The Journal of neuroscience*, 22(14):6265–6271.
60. P. A. Accorsi, A. Munno, M. Gamberoni, R. Viggiani, M. de Ambrogi, C. Tamanini, E. Seren (2007). Role of leptin on growth hormone and prolactin secretion by bovine pituitary explants. *Journal of dairy science*, 90(4):1683–1691.
61. K. Kirsz, M. Szczesna, K. Dudek, P. M. Bartlewski, D. A. Zieba (2014). Influence of season and nutritional status on the direct effects of leptin, orexin-A and ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone secretion in the ovine pituitary explant model. *Domestic animal endocrinology*, 48:69–76.
62. Z. Laron (2001). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Molecular pathology*, 54(5):311–316.
63. L. Laviola, A. Natalicchio, F. Giorgino (2007). The IGF-I signaling pathway. *Current pharmaceutical design*, 13(7):663–669.
64. R. C. Baxter (1986). The somatomedins: insulin-like growth factors. In: *Advances in clinical chemistry*, 1st edition, H. E. Spiegel (ed.), Academic Press, London, 49–115.
65. C. P. Velloso (2008). Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *British journal of pharmacology*, 154(3):557–568.

66. S. Perrini, L. Laviola, M. C. Carreira, A. Cignarelli, A. Natalicchio, F. Giorgino (2010). The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *The Journal of endocrinology*, 205(3):201–210.
67. R. D. Kineman, M. Del Rio-Moreno, A. Sarmiento-Cabral (2018). 40 years of IGF1: Understanding the tissue-specific roles of IGF1/IGF1R in regulating metabolism using the Cre/loxP system. *Journal of molecular endocrinology*, 61(1):T187-T198.
68. S. L. Asa, K. T. Coschigano, L. Bellush, J. J. Kopchick, S. Ezzat (2000). Evidence for growth hormone (GH) autoregulation in pituitary somatotrophs in GH antagonist-transgenic mice and GH receptor-deficient mice. *The American journal of pathology*, 156(3):1009–1015.
69. H. Zhou, W. K. W. Ko, W. K. K. Ho, S. S. Stojilkovic, A. O. L. Wong (2004). Novel aspects of growth hormone (GH) autoregulation: GH-induced GH gene expression in grass carp pituitary cells through autocrine/paracrine mechanisms. *Endocrinology*, 145(10):4615–4628.
70. G. T. Ooi, N. Tawadros, R. M. Escalona (2004). Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Molecular and cellular endocrinology*, 228(1-2):1–21.
71. K. Moser (2017). Charakterisierung von Hypophysenveränderungen bei Klein- und Heimtieren. Dissertationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München.
72. H. E. König und H.-G. Liebich (2015). Endokrine Drüsen. In: *Anatomie der Haussäugetiere*. 6. überarbeitete und erweiterte Auflage, H. E. König, H.-G. Liebich (Hg.), Schattauer, Stuttgart, 557–566.
73. H. Černý und U. Gille (2008). Endokrine Drüsen. In: *Anatomie für die Tiermedizin*. 2. überarbeitete und erweiterte Auflage, F.-V. Salomon, H. Geyer, U. Gille, W. Achilles (Hg.), Enke, Stuttgart, 622–632.
74. I. Doniach (1977). Histopathology of the anterior pituitary. *Clinics in endocrinology and metabolism*, 6(1):21–52.

75. M. Kabuto, T. Kubota, H. Kobayashi, T. Nakagawa, R. Kitai, T. Kodera (1995). Detection of mammosomatotroph cells and identification of the coexistence of growth hormone and prolactin within the same secretory granules in these cells using confocal laser scanning microscopy. *Histochemistry and cell biology*, 104(5):363–367.
76. J. S. Lee, K. Jeftinija, S. Jeftinija, M. H. Stromer, C. G. Scanes, L. L. Anderson (2004). Immunocytochemical distribution of somatotrophs in porcine anterior pituitary. *Histochemistry and cell biology*, 122(6):571–577.
77. L. B. Mitrofanova, P. V. Konovalov, J. S. Krylova, V. O. Polyakova, I. M. Kvetnoy (2017). Plurihormonal cells of normal anterior pituitary: facts and conclusions. *Oncotarget*, 8(17):29282–29299.
78. C. G. Scanes, S. Jeftinija, A. Glavaski-Joksimovic, J. Proudman, C. Arámburo, L. L. Anderson (2005). The anterior pituitary gland: lessons from livestock. *Domestic animal endocrinology*, 29(1):23–33.
79. P. R. Le Tissier, D. J. Hodson, C. Lafont, P. Fontanaud, M. Schaeffer, P. Mollard (2012). Anterior pituitary cell networks. *Frontiers in neuroendocrinology*, 33(3):252–266.
80. M. Takeuchi (2001). The mammalian pars intermedia: structure and function. *Zoological Science*, 18(2):133–144.
81. F. Nassiri, M. Cusimano, J. A. Zuccato, S. Mohammed, F. Rotondo, E. Horvath, L. V. Syro, K. Kovacs, R. V. Lloyd (2013). Pituitary stem cells: candidates and implications. *Pituitary*, 16(3):413–418.
82. E. Horvath, K. Kovacs (1988). Fine structural cytology of the adenohipophysis in rat and man. *Journal of electron microscopy technique*, 8(4):401–432.
83. J.-S. Lee (2006). Comparative study of immunocytochemical patterns of somatotrophs, mammotrophs, and mammosomatotrophs in the porcine anterior pituitary. Dissertation, Iowa State University.

84. F. Dacheux (1980). Ultrastructural immunocytochemical localization of prolactin and growth hormone in the porcine pituitary. *Cell Tissue Res*, 207(2):277–286.
85. X. Bonnefont, A. Lacampagne, A. Sanchez-Hormigo, E. Fino, A. Creff, M.-N. Mathieu, S. Smallwood, D. Carmignac, P. Fontanaud, P. Travo, G. Alonso, N. Courtois-Coutry, S. M. Pincus, I. C. A. F. Robinson, P. Mollard (2005). Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46):16880–16885.
86. C. Lafont, M. G. Desarménien, M. Cassou, F. Molino, J. Lecoq, D. Hodson, A. Lacampagne, G. Mennessier, T. El Yandouzi, D. Carmignac, P. Fontanaud, H. Christian, N. Coutry, M. Fernandez-Fuente, S. Charpak, P. Le Tissier, I. C. A. F. Robinson, P. Mollard (2010). Cellular in vivo imaging reveals coordinated regulation of pituitary microcirculation and GH cell network function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9):4465–4470.
87. C. H. Li, W.-K. Liu (1964). Human pituitary growth hormone. *Experientia*, 20(4):169–178.
88. S. Handwerger, M. Freemark (2000). The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism*, 13(4):343–356.
89. S. S. Abdel-Meguid, H. S. Shieh, W. W. Smith, H. E. Dayringer, B. N. Violand, L. A. Bentle (1987). Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(18):6434–6437.
90. L. L. Anderson (2014). Insights into the nanobiology of growth hormone secretion. *Discoveries*, 2(3):e22.

91. S.-J. Cho, M. Kelly, K. T. Rognlien, J. A. Cho, J. K. H. Hörber, B. P. Jena (2002). SNAREs in opposing bilayers interact in a circular array to form conducting pores. *Biophysical journal*, 83(5):2522–2527.
92. E. Wolf, K. Rapp, G. Brem (1991). Expression of metallothionein-human growth hormone fusion genes in transgenic mice results in disproportionate skeletal gigantism. *Growth, development, and aging*, 55(2):117–127.
93. R. Wanke, E. Wolf, W. Hermanns, S. Folger, T. Buchmüller, G. Brem (1992). The GH-transgenic mouse as an experimental model for growth research: clinical and pathological studies. *Hormone research*, 37:74–87.
94. F. Eckstein, A. Weusten, C. Schmidt, U. Wehr, R. Wanke, W. Rambeck, E. Wolf, S. Mohan (2004). Longitudinal in vivo effects of growth hormone overexpression on bone in transgenic mice. *Journal of bone and mineral research*, 19(5):802–810.
95. R. C. Olney (2003). Regulation of bone mass by growth hormone. *Medical and pediatric oncology*, 41(3):228–234.
96. A. Sicuro, K. Mahlbacher, H. N. Hulter, R. Krapf (1998). Effect of growth hormone on renal and systemic acid-base homeostasis in humans. *The American journal of physiology*, 274(4):F650-F657.
97. M. C. Gelato (1993). Growth hormone-insulin like growth factor I and immune function. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 4(3):106–110.
98. N. Hattori, T. Saito, T. Yagyu, B. H. Jiang, K. Kitagawa, C. Inagaki (2001). GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86(9):4284–4291.
99. M. C. Postel-Vinay, P. A. Kelly (1996). Growth hormone receptor signalling. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism*, 10(3):323–336.

100. H. E. Bergan-Roller, M. A. Sheridan (2018). The growth hormone signaling system: Insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. *General and comparative endocrinology*, 258:119–133.
101. S. I. Ymer, A. C. Herington (1985). Evidence for the specific binding of growth hormone to a receptor-like protein in rabbit serum. *Molecular and cellular endocrinology*, 41(2-3):153–161.
102. F. Hannah-Shmouni, G. Trivellin, C. A. Stratakis (2016). Genetics of gigantism and acromegaly. *Growth hormone & IGF research*, 30-31:37–41.
103. A. Colao, L. F. S. Grasso, A. Giustina, S. Melmed, P. Chanson, A. M. Pereira, R. Pivonello (2019). Acromegaly. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1):20.
104. P. E. Mullis (2010). Genetics of isolated growth hormone deficiency. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*, 2(2):52–62.
105. K. S. Alatzoglou, J. P. Turton, D. Kelberman, P. E. Clayton, A. Mehta, C. Buchanan, S. Aylwin, E. C. Crowne, H. T. Christesen, N. T. Hertel, P. J. Trainer, M. O. Savage, J. Raza, K. Banerjee, S. K. Sinha, S. Ten, T. Mushtaq, R. Brauner, T. D. Cheetham, P. C. Hindmarsh, P. E. Mullis, M. T. Dattani (2009). Expanding the spectrum of mutations in GH1 and GHRHR: genetic screening in a large cohort of patients with congenital isolated growth hormone deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 94(9):3191–3199.
106. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. GH Research Society (2000). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 85(11):3990–3993.
107. T. Ertekin, N. Acer, A. T. Turgut, K. Aycan, O. Ozcelik, M. Turgut (2011). Comparison of three methods for the estimation of the pituitary gland volume using magnetic resonance imaging: a stereological study. *Pituitary*, 14(1):31–38.

108. A. Deeb, S. Attia, G. Elhag, A. El Fatih, J. Reddy, N. Nagelkerke (2015). Pituitary gland size is a useful marker in diagnosing isolated growth hormone deficiency in short children. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism*, 28(9-10):981–984.
109. Z. Laron, J. Kopchick (2011). *Laron syndrome - from man to mouse. Lessons from clinical and experimental experience*, 1st edition, Springer-Verlag, Heidelberg.
110. A. Hinrichs, B. Kessler, M. Kurome, A. Blutke, E. Kemter, M. Bernau, A. M. Scholz, B. Rathkolb, S. Renner, S. Bultmann, H. Leonhardt, M. H. de Angelis, H. Nagashima, A. Hoeflich, W. F. Blum, M. Bidlingmaier, R. Wanke, M. Dahlhoff, E. Wolf (2018). Growth hormone receptor-deficient pigs resemble the pathophysiology of human Laron syndrome and reveal altered activation of signaling cascades in the liver. *Molecular metabolism*, 11:113–128.
111. H. L. Storr, S. Chatterjee, L. A. Metherell, C. Foley, R. G. Rosenfeld, P. F. Backeljauw, A. Dauber, M. O. Savage, V. Hwa (2019). Nonclassical GH insensitivity: characterization of mild abnormalities of GH action. *Endocrine reviews*, 40(2):476–505.
112. R. G. Rosenfeld, A. L. Rosenbloom, J. Guevara-Aguirre (1994). Growth hormone (GH) insensitivity due to primary GH receptor deficiency. *Endocrine reviews*, 15(3):369–390.
113. J. Guevara-Aguirre, P. Balasubramanian, M. Guevara-Aguirre, M. Wei, F. Madia, C. W. Cheng, D. Hwang, A. Martin-Montalvo, J. Saavedra, S. Ingles, R. de Cabo, P. Cohen, V. D. Longo (2011). Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans. *Science translational medicine*, 3(70):70ra13.
114. M. G. Lake, L. S. Krook, S. V. Cruz (2013). Pituitary adenomas: an overview. *American family physician*, 88(5):319–327.

115. A.J. D'Ercole, G. T. Applewhite, L. E. Underwood (1980). Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Developmental Biology*, 75(2):315–328.
116. J. L. Liu, D. Le Roith (1999). Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocrinology*, 140(11):5178–5184.
117. L. Powell-Braxton, P. Hollingshead, C. Warburton, M. Dowd, S. Pitts-Meek, D. Dalton, N. Gillett, T. A. Stewart (1993). IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes & development*, 7(12B):2609–2617.
118. E. Rinderknecht, R. E. Humbel (1978). The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *The Journal of biological chemistry*, 253(8):2769–2776.
119. T. E. Adams, V. C. Epa, T. P. Garrett, C. W. Ward (2000). Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cellular and molecular life sciences*, 57(7):1050–1093.
120. A. Hoeflich, M. M. Weber, T. Fisch, S. Nedbal, C. Fottner, M. W. Elmlinger, R. Wanke, E. Wolf (2002). Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) separates hypertrophic and hyperplastic effects of growth hormone (GH)/IGF1 excess on adrenocortical cells in vivo. *The FASEB journal*, 16(13):1721–1731.
121. E. Wolf, M. R. Schneider, R. Zhou, T. M. Fisch, N. Herbach, M. Dahlhoff, R. Wanke, A. Hoeflich (2005). Functional consequences of IGFBP excess—lessons from transgenic mice. *Pediatric nephrology*, 20(3):269–278.
122. R. Monzavi, P. Cohen (2002). IGFs and IGFBPs: role in health and disease. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 16(3):433–447.

123. E. Wirthgen, C. Hoflich, M. Spitschak, C. Helmer, B. Brand, J. Langbein, F. Metzger, A. Hoeflich (2016). Quantitative Western ligand blotting reveals common patterns and differential features of IGFBP-fingerprints in domestic ruminant breeds and species. *Growth hormone & IGF research*, 26:42–49.
124. M. R. Schneider, H. Lahm, M. Wu, A. Hoeflich, E. Wolf (2000). Transgenic mouse models for studying the functions of insulin-like growth factor-binding proteins. *The FASEB journal*, 14(5):629–640.
125. E. Wolf, H. Lahm, M. Wu, R. Wanke, A. Hoeflich (2000). Effects of IGFBP-2 overexpression in vitro and in vivo. *Pediatric nephrology*, 14(7):572–578.
126. R. Zhou, H. Flaswinkel, M. R. Schneider, H. Lahm, A. Hoeflich, R. Wanke, E. Wolf (2004). Insulin-like growth factor-binding protein-4 inhibits growth of the thymus in transgenic mice. *Journal of molecular endocrinology*, 32(2):349–364.
127. M. R. Schneider, E. Wolf, A. Hoeflich, H. Lahm (2002). IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own. *The Journal of endocrinology*, 172(3):423–440.
128. L. A. Bach (2015). Recent insights into the actions of IGFBP-6. *Journal of cell communication and signaling*, 9(2):189–200.
129. P. F. Collett-Solberg, P. Cohen (2000). Genetics, chemistry, and function of the IGF/IGFBP system. *Endocrine*, 12(2):121–136.
130. Y.-H. Song, J. L. Song, P. Delafontaine, M. P. Godard (2013). The therapeutic potential of IGF-I in skeletal muscle repair. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(6):310–319.
131. A. Vijayakumar, N. J. Buffin, E. J. Gallagher, J. Blank, Y. Wu, S. Yakar, D. LeRoith (2013). Deletion of growth hormone receptors in postnatal skeletal muscle of male mice does not alter muscle mass and response to pathological injury. *Endocrinology*, 154(10):3776–3783.

132. S. Lee, E. R. Barton, H. L. Sweeney, R. P. Farrar (2004). Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *Journal of applied physiology*, 96(3):1097–1104.
133. M. Nagulesparen, R. Trickey, M. J. Davies, J. S. Jenkins (1976). Muscle changes in acromegaly. *British medical journal*, 2(6041):914–915.
134. D. R. Clemmons (2009). Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(7):349–356.
135. M. Bosch-Marcé, C. D. Wee, T. L. Martinez, C. E. Lipkes, D. W. Choe, L. Kong, J. P. van Meerbeke, A. Musarò, C. J. Sumner (2011). Increased IGF-1 in muscle modulates the phenotype of severe SMA mice. *Human molecular genetics*, 20(9):1844–1853.
136. S. Saenger, B. Holtmann, M. R. Nilges, S. Schroeder, A. Hoeflich, H. Kletzl, W. Spooren, S. Ostrowitzki, T. Hanania, M. Sendtner, F. Metzger (2012). Functional improvement in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis by PEGylated insulin-like growth factor I treatment depends on disease severity. *Amyotrophic lateral sclerosis*, 13(5):418–429.
137. S. M. Gehrig, C. van der Poel, A. Hoeflich, T. Naim, G. S. Lynch, F. Metzger (2012). Therapeutic potential of PEGylated insulin-like growth factor I for skeletal muscle disease evaluated in two murine models of muscular dystrophy. *Growth hormone & IGF research*, 22(2):69–75.
138. E. Meryon (1852). On granular and fatty degeneration of the voluntary muscles. *Medico-chirurgical transactions*, 35:73-84.
139. A. E. H. Emery, F. Muntoni, R. Quinlivan (2015). *Duchenne muscular dystrophy*. 4th edition, University Press, Oxford.

140. M. Koenig, A. H. Beggs, M. Moyer, S. Scherpf, K. Heindrich, T. Bettecken, G. Meng, C. R. Müller, M. Lindlöf, H. Kaariainen, A. de La Chapellet, A. Kiuru, M. L. Savontaus, H. Gilgenkrantz, D. Récan, J. Chelly, J. C. Kaplan, A. E. Covone, N. Archidiacono, G. Romeo, S. Liechti-Gailati, V. Schneider, S. Braga, H. Moser, B. T. Darras, P. Murphy, U. Francke, J. D. Chen, G. Morgan, M. Denton, C. R. Greenberg, K. Wrogemann, L. A. Blonden, M. B. van Paassen, G. J. van Ommen, L. M. Kunkel (1989). The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *American journal of human genetics*, 45(4):498–506.
141. Becker P.E., Kiener F. (1955). Eine neue x-chromosomale Muskeldystrophie. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 193(4):427–448.
142. M. Rodríguez-Cruz, R. Sanchez, R. E. Escobar, O. D. R. Cruz-Guzmán, M. López-Alarcón, M. Bernabe García, R. Coral-Vázquez, G. Matute, A. C. Velázquez Wong (2015). Evidence of insulin resistance and other metabolic alterations in boys with Duchenne or Becker muscular dystrophy. *International journal of endocrinology*, 2015:867273.
143. A. P. Monaco, R. L. Neve, C. Colletti-Feener, C. J. Bertelson, D. M. Kurnit, L. M. Kunkel (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*, 323(6089):646–650.
144. H. Moser (1984). Duchenne muscular dystrophy: Pathogenetic aspects and genetic prevention. *Human Genetics*, 66(1):17–40.
145. A. Aartsma-Rus, J. C. T. van Deutekom, I. F. Fokkema, G.-J. B. van Ommen, J. T. Den Dunnen (2006). Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle & nerve*, 34(2):135–144.

146. N. Doorenweerd, A. Mahfouz, M. van Putten, R. Kaliyaperumal, P. A. C. t' Hoen, J. G. M. Hendriksen, A. M. Aartsma-Rus, J. J. G. M. Verschuuren, E. H. Niks, M. J. T. Reinders, H. E. Kan, B. P. F. Lelieveldt (2017). Timing and localization of human dystrophin isoform expression provide insights into the cognitive phenotype of Duchenne muscular dystrophy. *Scientific reports*, 7(1):12575.
147. M. Sekiguchi (2005). The role of dystrophin in the central nervous system: a mini review. *Acta myologica: myopathies and cardiomyopathies*, 24(2):93–97.
148. A. H. Ahn, L. M. Kunkel (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature genetics*, 3(4):283–291.
149. M. Naidoo, K. Anthony (2020). Dystrophin Dp71 and the neuropathophysiology of Duchenne muscular dystrophy. *Molecular neurobiology*, 57(3):1748–1767.
150. T. Kawaguchi, E. T. E. Niba, A. Q. M. Rani, Y. Onishi, M. Koizumi, H. Awano, M. Matsumoto, M. Nagai, S. Yoshida, S. Sakakibara, N. Maeda, O. Sato, H. Nishio, M. Matsuo (2018). Detection of dystrophin Dp71 in human skeletal muscle using an automated capillary western assay system. *International journal of molecular sciences*, 19(6):1546.
151. J. T. Den Dunnen, P. M. Grootsholten, E. Bakker, L. A. Blonden, H. B. Ginjaar, M. C. Wapenaar, H. M. van Paassen, C. van Broeckhoven, P. L. Pearson, G. J. van Ommen (1989). Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *American journal of human genetics*, 45(6):835–847.
152. M. Koenig, E. P. Hoffman, C. J. Bertelson, A. P. Monaco, C. Feener, L. M. Kunkel (1987). Complete cloning of the duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 50(3):509–517.

153. M. Leyva-Leyva, A. Sandoval, R. Felix, R. González-Ramírez (2018). Biochemical and functional interplay between Ion channels and the components of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *The Journal of membrane biology*, 251(4):535–550.
154. K. A. Lavidis, R. Kakkar, E. M. McNally (2004). The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circulation research*, 94(8):1023–1031.
155. J. M. Ervasti (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochimica et biophysica acta*, 1772(2):108–117.
156. K. J. Nowak, K. E. Davies (2004). Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO reports*, 5(9):872–876.
157. D. Jones (2019). Duchenne muscular dystrophy awaits gene therapy. *Nature biotechnology*, 37(4):335–337.
158. A. Sadeghi, A. D. Doyle, B. D. Johnson (2002). Regulation of the cardiac L-type Ca²⁺ channel by the actin-binding proteins alpha-actinin and dystrophin. *American journal of physiology. Cell physiology*, 282(6):C1502-C1511.
159. N. P. Whitehead, E. W. Yeung, D. G. Allen (2006). Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(7):657–662.
160. C. F. Spurney (2011). Cardiomyopathy of Duchenne muscular dystrophy. current understanding and future directions. *Muscle & nerve*, 44(1):8–19.
161. C. D. Bell, P. E. Conen (1968). Histopathological changes in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the neurological sciences*, 7(3):529–544.

162. W. G. Bradley, P. Hudgson, P. F. Larson, T. A. Papapetropoulos, M. Jenkison (1972). Structural changes in the early stages of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 35(4):451–455.
163. I. A. Williams, D. G. Allen (2007). Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from mdx mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 292(2):H846-H855.
164. D. D’Amario, A. Amodeo, R. Adorisio, F. D. Tiziano, A. M. Leone, G. Perri, P. Bruno, M. Massetti, A. Ferlini, M. Pane, G. Niccoli, I. Porto, G. A. D’Angelo, J. A. Borovac, E. Mercuri, F. Crea (2017). A current approach to heart failure in Duchenne muscular dystrophy. *Heart*, 103(22):1770–1779.
165. V. J. Hinton, D. C. de Vivo, N. E. Nereo, E. Goldstein, Y. Stern (2001). Selective deficits in verbal working memory associated with a known genetic etiology: the neuropsychological profile of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 7(1):45–54.
166. M. A. Waldrop, K. M. Flanigan (2019). Update in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Current opinion in neurology*, 32(5):722–727.
167. N. J. Crabtree, J. E. Adams, R. Padidela, N. J. Shaw, W. Högler, H. Roper, I. Hughes, A. Daniel, M. Z. Mughal (2018). Growth, bone health & ambulatory status of boys with DMD treated with daily vs. intermittent oral glucocorticoid regimen. *Bone*, 116:181–186.
168. C. M. McDonald, C. Campbell, R. E. Torricelli, R. S. Finkel, K. M. Flanigan, N. Goemans, P. Heydemann, A. Kaminska, J. Kirschner, F. Muntoni, A. N. Osorio, U. Schara, T. Sejersen, P. B. Shieh, H. L. Sweeney, H. Topaloglu, M. Tulinius, J. J. Vilchez, T. Voit, B. Wong, G. Elfring, H. Kroger, X. Luo, J. McIntosh, T. Ong, P. Riebling, M. Souza, R. J. Spiegel, S. W. Peltz, E. Mercuri (2017). Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 390(10101):1489–1498.

169. T. Yokota, Q. L. Lu, T. Partridge, M. Kobayashi, A. Nakamura, S. Takeda, E. Hoffman (2009). Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Annals of neurology*, 65(6):667–676.
170. C. A. Stein, D. Castanotto (2017). FDA-approved oligonucleotide therapies in 2017. *Molecular therapy*, 25(5):1069–1075.
171. J. R. Mendell, N. Goemans, L. P. Lowes, L. N. Alfano, K. Berry, J. Shao, E. M. Kaye, E. Mercuri (2016). Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Annals of neurology*, 79(2):257–271.
172. S. Q. Harper, M. A. Hauser, C. DelloRusso, D. Duan, R. W. Crawford, S. F. Phelps, H. A. Harper, A. S. Robinson, J. F. Engelhardt, S. V. Brooks, J. S. Chamberlain (2002). Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nature medicine*, 8(3):253–261.
173. K. R. Q. Lim, C. Yoon, T. Yokota (2018). Applications of CRISPR/Cas9 for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of personalized medicine*, 8(4):38.
174. E. Le Rumeur (2015). Dystrophin and the two related genetic diseases, Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 15(3):14–20.
175. B. U. Nwosu, M. M. Lee (2008). Evaluation of short and tall stature in children. *American family physician*, 78(5):597–604.
176. R. J. Kuczmarski, C. L. Ogden, S. S. Guo, L. M. Grummer-Strawn, K. M. Flegal, Z. Mei, R. Wei, L. R. Curtin, A. F. Roche, C. L. Johnson (2002). 2000 CDC growth charts for the United States: methods and development. *Vital and health statistics*, (246):1–190.
177. U. Eiholzer, E. Boltshauser, D. Frey, L. Molinari, M. Zachmann (1988). Short stature: a common feature in Duchenne muscular dystrophy. *European journal of pediatrics*, 147(6):602–605.

178. A. Y. Manzur, T. Kuntzer, M. Pike, A. Swan (2008). Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. The Cochrane database of systematic reviews, 2008(1):CD003725.
179. M. L. Bianchi, D. Biggar, K. Bushby, A. D. Rogol, M. M. Rutter, B. Tseng (2011). Endocrine aspects of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular disorders*, 21(4):298–303.
180. B. L. Wong, I. Rybalsky, K. C. Shellenbarger, C. Tian, M. A. McMahon, M. M. Rutter, H. Sawnani, J. L. Jefferies (2017). Long-term outcome of interdisciplinary management of patients with Duchenne muscular dystrophy receiving daily glucocorticoid treatment. *The Journal of pediatrics*, 182:296-303.
181. E. Canalis (2005). Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Current osteoporosis reports*, 3(3):98–102.
182. C. Jux, K. Leiber, U. Hügel, W. Blum, C. Ohlsson, G. Klaus, O. Mehls (1998). Dexamethasone impairs growth hormone (GH)-stimulated growth by suppression of local insulin-like growth factor (IGF)-I production and expression of GH- and IGF-I-receptor in cultured rat chondrocytes. *Endocrinology*, 139(7):3296–3305.
183. A. Giustina, W. B. Wehrenberg (1992). The role of glucocorticoids in the regulation of growth hormone secretion mechanisms and clinical significance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 3(8):306–311.
184. B. A. Valentine, B. J. Cooper, J. F. Cummings, A. de Lahunta (1990). Canine X-linked muscular dystrophy. morphologic lesions. *Journal of the neurological sciences*, 97(1):1–23.
185. B. El-Aloul, K. N. Speechley, Y. Wei, P. Wilk, C. Campbell (2020). Fatigue in young people with Duchenne muscular dystrophy. *Developmental medicine and child neurology*, 62(2):245–251.
186. W. R. Nakagaki, C. A. Bertran, C. Y. Matsumura, H. Santo-Neto, J. A. Camilli (2011). Mechanical, biochemical and morphometric alterations in the femur of mdx mice. *Bone*, 48(2):372–379.

187. M. F. Messina, M. Aguenouz, T. Arrigo, C. Rodolico, M. Valenzise, O. Musumeci, G. Vita, N. Lanzano, F. de Luca (2008). Novel SHOX gene mutation in a short boy with Becker muscular dystrophy: double trouble in two adjacent genes. *Hormone research*, 69(2):124–128.
188. M. Zatz, D. Rapaport, R. C. Pavanello, J. M. Rocha, M. Vainzof, W. Nicolau (1989). Nocturnal rhythm of growth hormone in Duchenne patients. effect of different doses of mazindol and/or cyproheptadine. *American journal of medical genetics*, 33(4):457–467.
189. L. Merlini, C. Granata, A. Ballestrazzi, F. Cornelio, P. Tassoni, S. Tugnoli, E. Cacciari (1988). Growth hormone evaluation in Duchenne muscular dystrophy. *Italian journal of neurological sciences*, 9(5):471–475.
190. M. Villarreal-Silva, F. Centeno-Cruz, R. Suárez-Sánchez, E. Garrido, B. Cisneros (2011). Knockdown of dystrophin Dp71 impairs PC12 cells cycle: localization in the spindle and cytokinesis structures implies a role for Dp71 in cell division. *PLoS One*, 6(8):e23504.
191. O. Chávez, M. C. Harricane, V. Alemán, L. Dorbani, C. Larroque, D. Mornet, A. Rendon, D. Martínez-Rojas (2000). Mitochondrial expression of a short dystrophin-like product with molecular weight of 71 kDa. *Biochemical and biophysical research communications*, 274(2):275–280.
192. T. Ghafoor, A. Mahmood, S. Shams (2003). Duchenne muscular dystrophy with associated growth hormone deficiency. *Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan*, 13(12):722–723.
193. M. Zatz, R. T. Betti, O. Frota-Pessoa (1986). Treatment of Duchenne muscular dystrophy with growth hormone inhibitors. *American journal of medical genetics*, 24(3):549–566.
194. J. H. Coakley, J. Moorcraft, L. J. Hipkin, C. S. Smith, R. D. Griffiths, R. H. Edwards (1988). The effect of mazindol on growth hormone secretion in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 51(12):1551–1557.

195. J. A. Javitch, S. M. Strittmatter, S. H. Snyder (1985). Differential visualization of dopamine and norepinephrine uptake sites in rat brain using ³Hmazindol autoradiography. *The Journal of neuroscience*, 5(6):1513–1521.
196. R. C. Griggs, R. T. Moxley, J. R. Mendell, G. M. Fenichel, M. H. Brooke, P. J. Miller, S. Mandel, J. Florence, J. Schierbecker, K. K. Kaiser (1990). Randomized, double-blind trial of mazindol in Duchenne dystrophy. *Muscle & nerve*, 13(12):1169–1173.
197. G. R. Frank, R. E. Smith (2001). Effective growth hormone therapy in a growth hormone deficient patient with Duchenne muscular dystrophy without evidence of acceleration of the dystrophic process. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism*, 14(2):211–214.
198. V. Calcaterra, A. Malvezzi, R. Togli, A. Berardinelli, E. Bozzola, M. Bozzola, D. Larizza (2013). Growth hormone deficiency in a patient with becker muscular dystrophy: a pediatric case report. *Case reports in endocrinology*, 2013:684249.
199. S. H. Yoon, M. D. Grynpas, J. Mitchell (2019). Growth hormone increases bone toughness and decreases muscle inflammation in glucocorticoid-treated mdx mice, model of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of bone and mineral research*, 34(8):1473–1486.
200. G. D. Shelton, E. Engvall (2005). Canine and feline models of human inherited muscle diseases. *Neuromuscular disorders*, 15(2):127–138.
201. C. A. Collins, J. E. Morgan (2003). Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *International journal of experimental pathology*, 84(4):165–172.
202. P. Sicinski, Y. Geng, A. S. Ryder-Cook, E. A. Barnard, M. G. Darlison, P. J. Barnard (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*, 244(4912):1578–1580.

203. E. Araki, K. Nakamura, K. Nakao, S. Kameya, O. Kobayashi, I. Nonaka, T. Kobayashi, M. Katsuki (1997). Targeted disruption of exon 52 in the mouse dystrophin gene induced muscle degeneration similar to that observed in Duchenne muscular dystrophy. *Biochemical and biophysical research communications*, 238(2):492–497.
204. A. E. Deconinck, J. A. Rafael, J. A. Skinner, S. C. Brown, A. C. Potter, L. Metzinger, D. J. Watt, J.G. Dickson, J. M. Tinsley, K. E. Davies (1997). Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 90(4):717–727.
205. K. Nakamura, W. Fujii, M. Tsuboi, J. Tanihata, N. Teramoto, S. Takeuchi, K. Naito, K. Yamanouchi, M. Nishihara (2014). Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Scientific reports*, 4:5635.
206. T. Larcher, A. Lafoux, L. Tesson, S. Remy, V. Thepenier, V. François, C. Le Guiner, H. Goubin, M. Dutilleul, L. Guigand, G. Toumaniantz, A. de Cian, C. Boix, J.-B. Renaud, Y. Cherel, C. Giovannangeli, J.-P. Concordet, I. Anegon, C. Huchet (2014). Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*, 9(10):e110371.
207. B. J. Cooper, N. J. Winand, H. Stedman, B. A. Valentine, E. P. Hoffman, L. M. Kunkel, M. O. Scott, K. H. Fischbeck, J. N. Kornegay, R. J. Avery (1988). The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature*, 334(6178):154–156.
208. S. J. Schatzberg, N. J. Olby, M. Breen, L. V. Anderson, C. F. Langford, H. F. Dickens, S. D. Wilton, C. J. Zeiss, M. M. Binns, J. N. Kornegay, G. E. Morris, N. J. Sharp (1999). Molecular analysis of a spontaneous dystrophin ‘knockout’ dog. *Neuromuscular disorders*, 9(5):289–295.
209. J. N. Kornegay (2017). The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal muscle*, 7(1):9.

210. P. P. Nghiem, E. P. Hoffman, P. Mittal, K. J. Brown, S. J. Schatzberg, S. Ghimbovschi, Z. Wang, J. N. Kornegay (2013). Sparing of the dystrophin-deficient cranial sartorius muscle is associated with classical and novel hypertrophy pathways in GRMD dogs. *The American journal of pathology*, 183(5):1411–1424.
211. J. Bailey, S. Pereira (2018). Advances in neuroscience imply that harmful experiments in dogs are unethical. *Journal of medical ethics*, 44(1):47–52.
212. F. Nguyen, Y. Cherel, L. Guigand, I. Goubault-Leroux, M. Wyers (2002). Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. *Journal of comparative pathology*, 126(2-3):100–108.
213. C. E. Ambrósio, M. C. Valadares, E. Zucconi, R. Cabral, P. L. Pearson, T. P. Gaiad, M. Canovas, M. Vainzof, M. A. Miglino, M. Zatz (2008). Ringo, a golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dog with absent dystrophin but normal strength. *Neuromuscular disorders*, 18(11):892–893.
214. G. L. Walmsley, V. Arechavala-Gomez, M. Fernandez-Fuente, M. M. Burke, N. Nagel, A. Holder, R. Stanley, K. Chandler, S. L. Marks, F. Muntoni, G. D. Shelton, R. J. Piercy (2010). A Duchenne muscular dystrophy gene hot spot mutation in dystrophin-deficient cavalier king charles spaniels is amenable to exon 51 skipping. *PLoS One*, 5(1):e8647.
215. N. J. Winand, M. Edwards, D. Pradhan, C. A. Berian, B. J. Cooper (1994). Deletion of the dystrophin muscle promoter in feline muscular dystrophy. *Neuromuscular disorders*, 4(5-6):433–445.
216. T. Sui, Y. S. Lau, D. Liu, T. Liu, L. Xu, Y. Gao, L. Lai, Z. Li, R. Han (2018). A novel rabbit model of Duchenne muscular dystrophy generated by CRISPR/Cas9. *Disease models & mechanisms*, 11(6):dmm032201.
217. T. Fröhlich, E. Kemter, F. Flenkenthaler, N. Klymiuk, K. A. Otte, A. Blutke, S. Krause, M. C. Walter, R. Wanke, E. Wolf, G. J. Arnold (2016). Progressive muscle proteome changes in a clinically relevant pig model of Duchenne muscular dystrophy. *Scientific reports*, 6:33362.

218. B. Aigner, S. Renner, B. Kessler, N. Klymiuk, M. Kurome, A. Wunsch, E. Wolf (2010). Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *Journal of molecular medicine*, 88(7):653–664.
219. A. P. Regensburger, L. M. Fonteyne, J. Jüngert, A. L. Wagner, T. Gerhalter, A. M. Nagel, R. Heiss, F. Flenkenthaler, M. Qurashi, M. F. Neurath, N. Klymiuk, E. Kemter, T. Fröhlich, M. Uder, J. Woelfle, W. Rascher, R. Trollmann, E. Wolf, M. J. Waldner, F. Knieling (2019). Detection of collagens by multispectral optoacoustic tomography as an imaging biomarker for Duchenne muscular dystrophy. *Nature medicine*, 25(12):1905–1915.
220. R. Wanke (2016). Quantifizierung in der Morphologie - Wozu und wie? In: Phänotypisierung-vom Schein zum Sein. Nova Acta Leopoldina, Band 121, Nr. 409, G. Brem (Hg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 59–81.
221. R. Wanke (2002). Stereology-benefits and pitfalls. *Experimental and toxicologic pathology*, 54(2):163–164.
222. R. Wanke (1996). Charakterisierung der renalen Alterationen Wachstumshormon-transgener Mäuse. Habilitationsschrift, Ludwigs-Maximilians-Universität München.
223. A. Blutke (2016). Functionally oriented quantitative morphological analyses for characterization of organ alterations in different animal models in biomedical research. Habilitationsschrift, Ludwigs-Maximilians-Universität München.
224. D. L. Brown (2017). Practical stereology applications for the pathologist. *Veterinary pathology*, 54(3):358–368.
225. C. V. Howard, M. G. Reed (2005). Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy, 2nd edition, BIOS Scientific Publishers, Abingdon.

226. H. J. G. Gundersen, R. Mirabile, D. Brown, R. W. Boyce (2013). Stereological principles and sampling procedures for toxicologic pathologists. In: Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology, 3rd edition, W. M. Haschek (ed.), Academic Press, London, 215–286.
227. E. R. Weibel (1979). Practical methods for biological morphometry. 1st edition, Academic Press, London.
228. N. Herbach, M. Bergmayr, B. Göke, E. Wolf, R. Wanke (2011). Postnatal development of numbers and mean sizes of pancreatic islets and beta-cells in healthy mice and GIPR(dn) transgenic diabetic mice. PLoS One, 6(7):e22814.
229. A. Noorafshan, L. Hoseini, S. Karbalay-Doust, E. Nadimi (2012). A simple stereological method for estimating the number and the volume of the pancreatic beta cells. Journal of the pancreas, 13(4):427–432.
230. R. E. Ferrando, J. R. Nyengaard, S. R. Hays, J. V. Fahy, P. G. Woodruff (2003). Applying stereology to measure thickness of the basement membrane zone in bronchial biopsy specimens. The Journal of allergy and clinical immunology, 112(6):1243–1245.
231. C. Casteleyn, A. Rekecki, A. van der Aa, P. Simoens, W. van den Broeck (2010). Surface area assessment of the murine intestinal tract as a prerequisite for oral dose translation from mouse to man. Laboratory animals, 44(3):176–183.
232. R. W. Boyce, K. A. Dorph-Petersen, L. Lyck, H. J. Gundersen (2010). Design-based stereology. introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. Toxicologic pathology, 38(7):1011–1025.
233. Herbert Haug (1987). The first ten years after the foundation of the international society for stereology in 1961. Acta Stereologica, 6:35–42.
234. P. R. Mouton (2005). History of modern stereology. International brain research organization. History of neuroscience, 2005.

235. M. A. Matthay (2010). Standards and recommendations for quantitative assessment of lung structure in research. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 298(5):L615.
236. E. R. Weibel, C. C. W. Hsia, M. Ochs (2007). How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry. *Journal of applied physiology*, 102(1):459–467.
237. J. L. Saver (2006). Time is brain-quantified. *Stroke*, 37(1):263–266.
238. N. Herbach, I. Schairer, A. Blutke, S. Kautz, A. Siebert, B. Goke, E. Wolf, R. Wanke (2009). Diabetic kidney lesions of GIPRdn transgenic mice. podocyte hypertrophy and thickening of the GBM precede glomerular hypertrophy and glomerulosclerosis. *American journal of physiology. Renal physiology*, 296(4):F819-829.
239. M. Abercrombie (1946). Estimation of nuclear population from microtome sections. *The Anatomical Record*, 94(2):239–247.
240. E. R. Weibel, D. M. GOMEZ (1962). A principle for counting tissue structures on random sections. *Journal of applied physiology*, 17:343–348.
241. D. C. Sterio (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of microscopy*, 134(2):127–136.
242. K. -A. Dorph-Petersen, J. R. Nyengaard, H. J. G. Gundersen (2001). Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size*. *Journal of microscopy*, 204(3):232–246.
243. L. M. Cruz-Orive, E. R. Weibel (1981). Sampling designs for stereology. *Journal of microscopy*, 122(3):235–257.
244. B. A. Albl (2016). Etablierung von standardisierten Probennahmeplänen für Organe und Gewebe porziner Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung. Dissertationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München.

245. H. J. Gundersen, E. B. Jensen (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of microscopy*, 147(3):229–263.
246. S. Tschanz, J. P. Schneider, L. Knudsen (2014). Design-based stereology. Planning, volumetry and sampling are crucial steps for a successful study. *Annals of anatomy*, 196(1):3–11.
247. H. Braendgaard, H. J. Gundersen (1986). The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *Journal of neuroscience methods*, 18(1-2):39–78.
248. M. Ochs, C. Mühlfeld (2013). Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 1: basic principles of lung stereology. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 305(1):L15-L22.
249. W. Scherle (1970). A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*, 26(1):57–60.
250. T. Mattfeldt, G. Mall, H. Gharehbaghi, P. Möller (1990). Estimation of surface area and length with the orientator. *Journal of microscopy*, 159(3):301–317.
251. T. Mattfeldt, H. J. Möbius, G. Mall (1985). Orthogonal triplet probes: an efficient method for unbiased estimation of length and surface of objects with unknown orientation in space. *Journal of microscopy*, 139(3):279–289.
252. B. Albl, S. Haesner, C. Braun-Reichhart, E. Streckel, S. Renner, F. Seeliger, E. Wolf, R. Wanke, A. Blutke (2016). Tissue sampling guides for porcine biomedical models. *Toxicologic pathology*, 44(3):414–420.
253. A. Blutke, R. Wanke (2018). Sampling strategies and processing of biobank tissue samples from porcine biomedical models. *Journal of visualized experiments (JoVE)*, (133):e57276.

254. J. R. Nyengaard, H. J. G. Gundersen (1992). The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens. *Journal of microscopy*, 165(3):427–431.
255. A. J. Baddeley, H. J. Gundersen, L. M. Cruz-Orive (1986). Estimation of surface area from vertical sections. *Journal of microscopy*, 142(3):259–276.
256. H. J. Gundersen, T. F. Bendtsen, L. Korbo, N. Marcussen, A. Moller, K. Nielsen, J. R. Nyengaard, B. Pakkenberg, F. B. Sorensen, A. Vesterby, et al. (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 96(5):379–394.
257. M. J. West (2012). *Introduction to stereology*. Cold Spring Harbor protocols, 2012(8):pdb.top070623.
258. V. A. Bratu, V. J. Erpenbeck, A. Fehrenbach, T. Rausch, S. Rittinghausen, N. Krug, J. M. Hohlfeld, H. Fehrenbach (2014). Cell counting in human endobronchial biopsies-disagreement of 2D versus 3D morphometry. *PLoS One*, 9(3):e92510.
259. D. M.D. de Groot (1988). Comparison of methods for the estimation of the thickness of ultrathin tissue sections. *Journal of microscopy*, 151(1):23–42.
260. C. Matenaers, B. Popper, A. Rieger, R. Wanke, A. Blutke (2018). Practicable methods for histological section thickness measurement in quantitative stereological analyses. *PLoS One*, 13(2):e0192879.
261. J. P. Schneider, M. Ochs (2014). Alterations of mouse lung tissue dimensions during processing for morphometry: a comparison of methods. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 306(4):L341-L350.

262. E. Wolf, K. Burchardt, A. Blutke, S. Krause, A. Wuensch, B. Kessler, V. Zakhartchenko, M. Kurome, E. Kemter, R. Wanke, H. Lochmüller, M. C. Walter, N. Klymiuk (2015). Maßgeschneiderte Schweinemodelle für monogene Erbkrankheiten des Menschen. In: *Erbfehler und Erbkrankheiten - "Erbsünden" ohne Sündenfall?* Nova Acta Leopoldina, Band 119, Nr. 402, G. Brem (Hg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 157–165.
263. J. E. Anderson, L. Liu, E. Kardami, L. J. Murphy (1994). The pituitary-muscle axis in mdx dystrophic mice. *Journal of the neurological sciences*, 123(1-2):80–87.
264. Q.-C. Huang, Z.-R. Xu, X.-Y. Han, W.-F. Li (2007). Effect of betaine on growth hormone pulsatile secretion and serum metabolites in finishing pigs. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 91(3-4):85–90.
265. J. Estrada, J. Sommer, B. Collins, B. Mir, A. Martin, A. York, R. M. Petters, J. A. Piedrahita (2007). Swine generated by somatic cell nuclear transfer have increased incidence of intrauterine growth restriction (IUGR). *Cloning and stem cells*, 9(2):229–236.
266. N. Klymiuk, F. Seeliger, M. Bohlooly-Y, A. Blutke, D. G. Rudmann, E. Wolf (2016). Tailored pig models for preclinical efficacy and safety testing of targeted therapies. *Toxicologic pathology*, 44(3):346–357.
267. D. Houzelstein, G. E. Lyons, J. Chamberlain, M. E. Buckingham (1992). Localization of dystrophin gene transcripts during mouse embryogenesis. *The Journal of cell biology*, 119(4):811–821.
268. L. Dorbani-Mamine, M. E. Stoeckel, V. Jancsik, G. Ayad, A. Rendon (1998). Dystrophins in neurohypophysial lobe of normal and dehydrated rats: immunolocalization and biochemical characterization. *Neuroreport*, 9(16):3583–3587.
269. R. Miranda, U. Nudel, S. Laroche, C. Vaillend (2011). Altered presynaptic ultrastructure in excitatory hippocampal synapses of mice lacking dystrophins Dp427 or Dp71. *Neurobiology of disease*, 43(1):134–141.

270. T. Tozawa, K. Itoh, T. Yaoi, S. Tando, M. Umekage, H. Dai, H. Hosoi, S. Fushiki (2012). The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. *Molecular neurobiology*, 45(2):287–297.
271. J. L. Anderson, S. I. Head, C. Rae, J. W. Morley (2002). Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain*, 125:4–13.
272. E. Somm, N. Bonnet, A. Martinez, P. M. Marks, V. A. Cadd, M. Elliott, A. Toulotte, S. L. Ferrari, R. Rizzoli, P. S. Huppi, E. Harper, S. Melmed, R. Jones, M. L. Aubert (2012). A botulinum toxin-derived targeted secretion inhibitor downregulates the GH/IGF1 axis. *The Journal of clinical investigation*, 122(9):3295–3306.
273. E. Fonfria, J. Maignel, S. Lezmi, V. Martin, A. Splevins, S. Shubber, M. Kalinichev, K. Foster, P. Picaut, J. Krupp (2018). The expanding therapeutic utility of botulinum neurotoxins. *Toxins*, 10(5):208.
274. V. P. Singh, K. Pratap, J. Sinha, K. Desiraju, D. Bahal, R. Kukreti (2016). Critical evaluation of challenges and future use of animals in experimentation for biomedical research. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 29(4):551–561.
275. M. M. Swindle, A. Makin, A. J. Herron, Clubb, F J, Jr, K. S. Frazier (2012). Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Veterinary pathology*, 49(2):344–356.
276. G. Karpati, S. Carpenter (1986). Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer deleterious consequences of dystrophic gene expression. *American journal of medical genetics*, 25(4):653–658.
277. G. B. Banks, J. S. Chamberlain (2008). The value of mammalian models for Duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. In: *Mouse models of developmental genetic disease*, 1st edition, R. Kraus (ed.), Academic Press, London, 431–453.

278. J. Leitenbacher, N. Herbach (2016). Age-related qualitative histological and quantitative stereological changes in the equine pituitary. *Journal of comparative pathology*, 154(2-3):215–224.
279. R. Wanke, S. Weis, D. Kluge, E. Kahnt, E. Schenck, G. Brem, W. Hermanns (1994). Morphometric evaluation of the pancreas of growth hormone-transgenic mice. *Acta Stereologica*, 13(1):3–8.
280. J. R. Nyengaard (1999). Stereologic methods and their application in kidney research. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(5):1100–1123.
281. T. Shinkai, Y. Sakurai, H. Ooka (1995). Age-related changes in the numbers of mammotrophs, somatotrophs and mammosomatotrophs in the anterior pituitary gland of female rats: a flow cytometric study. *Mechanisms of ageing and development*, 83(3):125–131.
282. F. Sasaki (1988). Changes with age in the number and size of anterior pituitary cells in female mice from suckling to adulthood. *The Journal of endocrinology*, 117(1):5–10.
283. S. Trifunovic, I. Lakic, P. Vujovic, T. Jevdjovic, B. Sosic-Jurjevic, V. Milosevic, J. Djordjevic (2019). Morphofunctional parameters of rat somatotrophes after acute and repeated immobilization or restraint stress. *Acta histochemica*, 121(1):29–34.
284. E. R. Barton, L. Morris, A. Musaro, N. Rosenthal, H. L. Sweeney (2002). Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *The Journal of cell biology*, 157(1):137–148.
285. A. R. Demonbreun, J. P. Fahrenbach, K. Deveaux, J. U. Earley, P. Pytel, E. M. McNally (2011). Impaired muscle growth and response to insulin-like growth factor 1 in dysferlin-mediated muscular dystrophy. *Human molecular genetics*, 20(4):779–789.

286. S. Duguez, W. Duddy, H. Johnston, J. Lainé, M. C. Le Bihan, K. J. Brown, A. Bigot, Y. Hathout, G. Butler-Browne, T. Partridge (2013). Dystrophin deficiency leads to disturbance of LAMP1-vesicle-associated protein secretion. *Cellular and molecular life sciences*, 70(12):2159–2174.

9 EIGENE PUBLIKATIONEN UND BEITRÄGE AUF WISSENSCHAFTLICHEN KONGRESSSEN

Publikationen in Fachzeitschriften mit Peer-Review-Verfahren:

- (1) I. Hofmann, E. Kemter, N. Theobalt, S. Fiedler, M. Bidlingmaier, A. Hinrichs, M. Aichler, K. Burkhardt, N. Klymiuk, E. Wolf, R. Wanke, A. Blutke (2020). Linkage between growth retardation and pituitary cell morphology in a dystrophin-deficient pig model of Duchenne muscular dystrophy. *Growth hormone & IGF research*, 51:6–16.
- (2) S. Fiedler, H. Wünnemann, I. Hofmann, N. Theobalt, A. Feuchtinger, A. Walch, J. Schwaiger, R. Wanke, A. Blutke (eingereicht am 29.06.2020). A practical guide to unbiased quantitative morphological analyses of the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in ecotoxicological studies. *PLoS One*.

Vorträge anlässlich der 62. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG):

- (1) I. Hofmann, N. Theobalt, S. Fiedler, E. Wolf, R. Wanke, A. Blutke (2019). Quantitativ-morphologische Untersuchungen der Hypophyse in einem porzinen Modell der Duchenne-Muskeldystrophie. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere*, 47(03):210.
- (2) A. Blutke, I. Hofmann, N. Theobalt, S. Fiedler, A. Feuchtinger, A. Walch, R. Wanke (2019). Lichtblattmikroskopie in der quantitativ-morphologischen Analyse von Gewebeproben, *Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere*, 47(03):210.

Posterbeiträge anlässlich der 62. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG):

- (1) N. Theobalt, S. Renner, A. Feuchtinger, A. Walch, I. Hofmann, S. Fiedler, R. Wanke, A. Blutke (2019). Quantitative Stereologie des Fettgewebes. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere*, 47(03):217.
- (2) S. Fiedler, H. Wünnemann, J. Schwaiger, A. Feuchtinger, A. Walch, I. Hofmann, N. Theobalt, R. Wanke, A. Blutke (2019). Quantitative Stereologie der Kiemen von Regenbogenforellen. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Großtiere*, 47(03):202.

10 DANKSAGUNG

Zuallererst gilt mein Dank meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. Rüdiger Wanke** (Professur für Molekulare und Experimentelle Pathologie, Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, LMU München) für seine unverzügliche Bereitschaft, die Betreuung dieses Dissertationsprojekts zu übernehmen und mich jederzeit mit seiner großen Erfahrung und seinem guten Rat dabei zu unterstützen.

Meinem Doktorvater **Herrn PD Dr. Andreas Parzefall** (Abteilung Analytische Pathologie, Helmholtz Zentrum München) danke ich für die Idee zu diesem Projekt und dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat in einem so interessanten Themenbereich zu promovieren. Er hat während der gesamten Arbeit maßgeblich die Entwicklung neuer wissenschaftlicher Ideen und Lösungsansätze initiiert, begleitet und gefördert, wofür ich ihm meinen herzlichen Dank ausspreche. Außerdem möchte ich meinen Dank ausdrücken für all die Zeit, die er auch weit über seine Tätigkeit als Privatdozent am Institut für Tierpathologie hinweg damit verbracht hat, mich als seine Doktorandin engagiert und umfassend zu betreuen.

Bedanken möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf** (Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, LMU München) für die zahlreichen Möglichkeiten zu spannenden Kooperationen im Rahmen dieses Dissertationsprojekts. Mein besonderer Dank gilt im Hinblick darauf **Frau PD Dr. Elisabeth Kemter** und **Herrn Dr. Arne Hinrichs** für ihre Unterstützung bei allen biochemischen Methoden, die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommen sind. Herzlich bedanken möchte ich mich für die kompetente praktische Einweisung in die Immunhistochemie und das Western Blot-Verfahren durch **Frau Tatiana Schröter**.

Frau Gabriele Mettenleiter (Abteilung Analytische Pathologie, Helmholtz Zentrum München) möchte ich für die freundliche Einweisung in die Elektronenmikroskopie und die ausgezeichnete praktische Betreuung danken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Bürokolleginnen und Mitdoktorandinnen am Institut für Tierpathologie **Frau Natalie Theobalt**, **Frau Sonja Fiedler** und **Frau Alexandra Schubö** für viele konstruktive stereologische Diskussionen und die hervorragende Zusammenarbeit sowie den einzigartigen Zusammenhalt.

Allen **Mitarbeitern des Instituts für Tierpathologie** möchte ich für die angenehme Atmosphäre und die entgegengebrachte, allgegenwärtige Hilfsbereitschaft am Institut danken. Vielen Dank für die großartige Unterstützung speziell an **Josef Grieser, Marold Handl, Mirjana Trajkovic, Lisa Pichl, Michaela Nützel, Doris Merl, Nadschman Rahimi, Heidrun Schöl, Sandra Aumiller und Claudia Mair**. Bei **Frau Marjam O´Gorman** möchte ich mich zusätzlich für die Hilfe bei allen organisatorischen Angelegenheiten und ihr allzeit offenes Ohr bedanken.

Dieses Dissertationsprojekt war nur dank der großzügigen Unterstützung der Begabtenförderung der **Hanns-Seidel-Stiftung e.V.**, unter der Leitung von **Herrn Prof. Hans-Peter Niedermeier**, möglich. **Herrn Dr. Andreas Burtscheidt** möchte ich für die gelungene Organisation fachlicher Seminarveranstaltungen im Rahmen der ideellen Förderung danken. Nicht zuletzt möchte ich mich bei **Herrn Dekan Prof. Dr. Reinhard Straubinger** (Tierärztliche Fakultät, LMU München) für seine wertvolle Tätigkeit als Vertrauensdozent bedanken.

Für den interdisziplinären fachlichen Austausch sowie für die anregenden und ermutigenden Diskussionen möchte ich mich bei **Frau Melanie Janda** und **Frau Dr. Stefanie Egerer** (Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie) sowie den Chemikern **Herrn Dr. Andreas Schedl** (Universität Bayreuth) und **Herrn Dr. Christoph Hasenöhr** (Victoria University of Wellington) bedanken. **Frau Lilian Buder** und **Herrn Andreas Blockinger** möchte ich für die mühevollen und engagierte Begutachtung dieser Arbeit danken.

Zuletzt gilt mein großer Dank **meinen Eltern** sowie meinem Bruder **Leo** für das hilfreiche Korrekturlesen. Mein herzlichster Dank gilt meinem Mann **Eddie**, der mir nicht nur fachlich jederzeit geduldig zur Seite gestanden hat, sondern auch als mein bester Freund und engster Vertrauter.