

Aus dem
Friedrich-Baur-Institut der Neurologischen Klinik und Poliklinik
Institut der Universität München

Direktor:
Univ. Prof. Dr. med. Günter U. Höglinger, FEAN

***Evaluation eines neuen translationalen Großtiermodells
für die Duchenne Muskeldystrophie
in der präklinischen Forschung***

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

vorgelegt von

Tina Tamara Donandt

aus Starnberg

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Maggie C. Walter

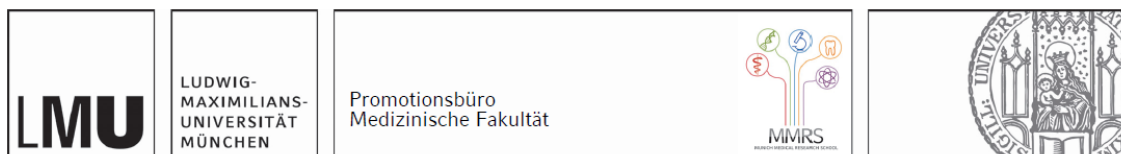
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Henning Wackerhage
Prof. Dr. Angela Abicht
Prof. Dr. Wolfgang Müller-Felber

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Peter Meinke
PD Dr. Dr. Sabine Krause

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2024

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Donandt, Tina Tamara

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Evaluation eines neuen translationalen Großtiermodells

für die Duchenne Muskeldystrophie in der präklinischen Forschung

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 18.08.2023

Ort, Datum

Tina Donandt

Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

Affidavit	3
Inhaltsverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis	6
Publikationsliste	7
1. Mein persönlicher Beitrag zu den Publikationen	9
1.1 Beitrag zu Paper I.....	9
1.2 Beitrag zu Paper II.....	11
2. Einleitung: Ein translationales Großtiermodell für die Duchenne Muskeldystrophie	12
2.1 Die Duchenne Muskeldystrophie	12
2.1.1 Krankheitsbild und Verlauf	12
2.1.2 Genetik	13
2.1.3 Dystrophin und der DMD-Pathomechanismus.....	14
2.1.4 Utrophin.....	15
2.1.5 Therapiemöglichkeiten	16
2.2 Tiermodelle für die Duchenne Muskeldystrophie	19
2.2.1 Murine Modelle	19
2.2.2 Canine Modelle	20
2.2.3 Porcines Modell: DMDpig	21
3. Darstellung des Forschungsvorhabens	23
4. Ergebnisse.....	24
4.1 Paper I.....	24
4.2 Paper II	27
5. Diskussion und Ausblick	31
6. Zusammenfassung	34
7. Abstract (English).....	35
8. Paper I	36
9. Paper II.....	49
10. Literaturverzeichnis	58
Danksagung	67

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Vereinfachte Darstellung des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes. (Stirm et al. 2022): Open Access Publikation mit CC-BY Lizenz..... 15
- Abbildung 2:** Vier Monate altes DMDpig (links: #7074) mit seinem WT-Wurfbruder (rechts: #7072) mit im Vergleich deutlichem Größen- und Muskelmassenunterschied (Gewichtsunterschied)..... 21
- Abbildung 3:** Verschiedene Muskeltypen wurden für die Muskelbank des DMDpigs verwendet. (Donandt et al. 2022): Open Access mit Lizenz „Creative Commons Attribution (CC BY)“ 25
- Abbildung 4:** Proliferation: (A) Prozentualer Anteil an Myoblasten (Desmin positive Zellen: grün) über 8 Passagen und Proliferationsniveau dieser Myoblasten (positive für Ki-67: pink) mit Standardabweichung, (B) Beispielbild für ein Übersichtsfoto, (C) Zellkultur eines DMDpigs (m. biceps femoris) über 8 Passagen. Maßstableisten 200 µm. (Donandt et al. 2022): Open Access mit Lizenz „Creative Commons Attribution (CC BY)“ 26
- Abbildung 5:** Differentiation von porcinen Myoblasten und Dystrophin Expression: Die Anzahl der Myotuben ist zwischen Tag 3-6 am höchsten und danach sinkt das Dystrophin-Level ab Tag 6 mit der Anzahl an Myotuben. (B) Der Western Blot zeigt die Expression von Dystrophin in porcinen WT-Zellkulturen. (C) Quantifizierung von Volllängen Dystrophin (427 kDa) und (D) der 71 kDa Isoform. (Donandt et al. 2022): Open Access mit Lizenz „Creative Commons Attribution (CC BY)“ 27
- Abbildung 6:** Humane (links), porcine (mitte) und murine (rechts) Myoblastenkulturen wurden 6 Tage lang differenziert. An Tag 0 wurde zu Differenzierungsmedium gewechselt und dann wurden alle 24h Objektträger fixiert und mit Dystrophin (links) und DAPI (rechts) gefärbt. Maßstableiste 20 µm. (Donandt et al. 2023): Open Access mit Lizenz „Creative Commons Attribution (CC BY)“ 29
- Abbildung 7:** Dystrophin-Nachweis im WB von Zellkernen je *in-vitro* Modell (human, porcine, murine) von Tag 0 (links) bis Tag 6 (rechts) der Differenzierung (A & B) im Vergleich zu Daten aus der RNA-Sequenzierung (C). (Donandt et al. 2023): Open Access mit Lizenz „Creative Commons Attribution (CC BY)“ 30

Abkürzungsverzeichnis

&	und
3R	3R-Prinzip („Replace, Reduce, Refine“)
AAV	Adeno-assoziierte Dependoparvoviren
AON	Antisense-Oligonukleotide
BMD	Becker Muskeldystrophie
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CKCS-MD	Cavalier King Charles Spaniel mit Muskeldystrophie
COI	Cost-of-Illness (deutsch: Krankheitskosten)
CXMDJ	Beagle-basierte X-chromosomale Muskeldystrophie in Japan
D	Deutschland
DGC	Dystrophin-Glykoprotein-Komplex
DMD	Duchenne Muskeldystrophie
DMDpig	Schwein mit Duchenne Muskeldystrophie durch Deletion von Exon 52 (= DMD Δ 52-Schwein)
Dp	Dystrophin-Protein
ECM	Extra-Zelluläre-Matrix
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur („European Medicines Agency“)
FBI	Friedrich-Baur-Institut
FDA	amerikanische Arzneimittel-Behörde („U.S. Food and Drug Administration“)
ggf.	gegebenenfalls
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GRMD	Golden Retriever Muskeldystrophie Hund
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
IF	Immunfluoreszenzfärbung
Mb	Million Basenpaare / Megabase (Maßeinheit)
<i>mdx</i>	“X-chromosome-linked muscular dystrophy” Maus
PFA	Paraformaldehyd
sog.	sogenannt
u. a.	unter anderem
vs.	versus
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

Publikationsliste

Publikationen als Teil dieser kumulativen Dissertation:

- I. **Donandt T**, Hintze S, Krause S, Wolf E, Schoser B, Walter MC, Meinke P. **Isolation and Characterization of Primary DMDpig Muscle Cells as an *in-vitro* Model for Preclinical Research on Duchenne Muscular Dystrophy.** *Life – Section: Cell Biology and Tissue Engineering.* 2022; 12(10): 1668. <https://doi.org/10.3390/life12101668>
- II. **Donandt T**, Todorow V, Hintze S, Graupner A, Schoser B, Walter MC, Meinke P. **Nuclear Small Dystrophin Isoforms during Muscle Differentiation.** *Life - Section: Physiology and Pathology.* 2023; 13(6): 1367. <https://doi.org/10.3390/life13061367>

Preise:

Bester Freier Vortrag des 26. Kongress des Medizinisch-Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke (DGM) e.V. 22.–24.03.2023 in Essen, Deutschland. Vortrag #FV13: *Isolierung und Charakterisierung von primären DMDpig Muskelzellen als Zellkulturmodell für die präklinische Forschung für Duchenne Muskeldystrophie.*

Vorträge:

Donandt T: *Isolierung und Charakterisierung von primären DMDpig Muskelzellen als Zellkulturmodell für die präklinische Forschung für Duchenne Muskeldystrophie.* 26. Kongress des Medizinisch-Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke (DGM) e.V. 22.–24.03.2023. Essen, Deutschland.

Donandt T: *Das DMDpig als translationales Großtiermodell für die Duchenne Muskeldystrophie in der präklinischen Forschung.* 25. Kongress des Medizinisch-Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke (DGM) e.V. 24.–27.03.2021. Jena, Deutschland; digital.

Poster:

Donandt T: *Evaluation eines neuen translationalen Großtiermodells für die Duchenne Muskeldystrophie in der präklinischen Forschung.* 24. Kongress des Medizinisch-Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke (DGM) e.V. 9.–11.05.2019; Göttingen, Deutschland.

Donandt T: *Personalized molecular therapy in a new translational large animal model for Duchenne muscular dystrophy.* 15th International Congress on Neuromuscular Diseases (ICNMD XV), 6.-10.07.2018; Wien, Österreich.

Donandt T: *Personalisierte molekulare Therapie in einem neuen translationalen Großtiermodell für die Duchenne Muskeldystrophie.* 23. Kongress des Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V., 16.-18.02.2017; München, Deutschland.

Weitere Publikationen:

Konferenz-Abstracts:

Donandt T, Hintze S, Krause S, Wolf E, Schoser B, Walter MC, Meinke P. *Isolierung und Charakterisierung von primären DMDpig Muskelzellen als Zellkulturmodell für die präklinische Forschung für Duchenne Muskeldystrophie*. 26. Kongress des Medizinisch-Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke (DGM) e.V. 22.–24.03.2023. Essen, Deutschland. (Online-Abstractband: www.DGM-Kongress.de).

Donandt T, Krause S, Kalbe C, Fonteyne LM, Kessler B, Wolf E, Walter MC. *Das DMDpig als translationales Großtiermodell für die Duchenne Muskeldystrophie in der präklinischen Forschung*. 25. Kongress des Medizinisch-Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke (DGM) e.V. 24.–27.03.2021. Jena, Deutschland; digital. *Nervenheilkunde* 2021; 40: 161-195.

Donandt T, Krause S, Schmuck M, Kalbe C, Fonteyne LM, Kessler B, Klymiuk N, Wolf E, Walter MC. *Evaluation eines neuen translationalen Großtiermodells für die Duchenne Muskeldystrophie in der präklinischen Forschung*. 24. Kongress des Medizinisch-Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke (DGM) e.V. 9.–11.05.2019. Göttingen, Deutschland. *Nervenheilkunde* 2019; 38(05): 302.

Donandt T, Reichert S, Schmuck M, Kalbe C, Kessler B, Blutke A, Wolf E, Krause S, Walter MC. *Personalized molecular therapy in a new translational large animal model for Duchenne muscular dystrophy*. 15th International Congress on Neuromuscular Diseases (ICNMD XV), Wien, Österreich. *Journal of Neuromuscular Diseases* 2018; 5(1): 155.

Donandt T, Schmuck M, Kalbe C, Reichert S, Kessler B, Blutke A, Wolf E, Krause S, Walter MC. *Personalisierte molekulare Therapie in einem neuen translationalen Großtiermodell für die Duchenne Muskeldystrophie*. 23. Kongress des Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V. München, Deutschland. *Nervenheilkunde* 2017; 36(01/02); 9.

Krause S, Reichert S, **Donandt T**, Kalbe C, Schmuck M, Klymiuk N, Kessler B, Blutke A, Wolf E, Schoser B, Walter MC. *Molecular therapy in a novel translational large animal model for Duchenne muscular dystrophy*. 22nd International Congress of the World Muscle Society (WMS), St. Malo, Frankreich. *Neuromuscular disorders*. 2017; 27: 188-189.

Reichert S, Schmuck M, Kalbe C, **Donandt T**, Kessler B, Blutke A, Wolf E, Schoser B, Walter MC, Krause S. *Molekulare Therapie im Zellkulturmodell der Duchenne Muskeldystrophie*. 23. Kongress des Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V. München, Deutschland. *Nervenheilkunde* 2017; 36(01/02): 28.

Buch:

Donandt T. *Konzept zur Entwicklung der Marke Deutsches Pferd: Neue Wege zur Imageförderung der deutschen Pferdezucht*. AV-Akademikerverlag, Saarbrücken, Deutschland. Taschenbuch 04/2014; ISBN-13: 28 978-3639633054.

1. Mein persönlicher Beitrag zu den Publikationen

1.1 Beitrag zu Paper I

Meinen persönlichen Beitrag an der Veröffentlichung „Isolation and Characterization of Primary DMDpig Muscle Cells as an *in-vitro* Model for Preclinical Research on Duchenne Muscular Dystrophy“ (Donandt et al. 2022) kann man zusammenfassend wie folgt darstellen:

1. Entnahme von verschiedenem Muskelgewebe bei zahlreichen Schweinen mit Duchenne Muskeldystrophie (DMDpigs) und deren Wildtyp-Geschwistern (WT) und dessen Kryokonservierung für den Aufbau einer Muskelbank für das translationale Großtiermodell DMDpig am Friedrich-Baur-Institut (FBI) (Abbildung 1 & 2 des Papers I).
2. Ansetzen zahlreicher primärer Satellitenzellkulturen aus zuvor entnommenem porcinem Muskelgewebe und dabei eine fortschreitende Optimierung der Methodik für das Anlegen von porcinen Myoblasten-Primärkulturen (siehe Methodenteil in Paper I).
3. Test von 36 verschiedenen Beschichtungsvarianten für einen optimalen Differenzierungsprozess und danach Etablierung der vielversprechendsten Beschichtungsmethode (Fibronektin) als Standard-Protokoll für porcine Muskelzellkulturen (Ergebnis: Abbildung 6 & 7 des Papers I).
4. Anzucht und Differenzierung von porcinen Zelllinien des WT über 45 Tage hinweg, um den optimalen Zellernte-Zeitpunkt zu identifizieren, an welchem Dystrophin im Zelllysate via Western Blot (WB) nachweisbar ist (Ergebnis: 4. – 6. Tag der Differenzierung, siehe Abbildung 5 des Papers I).
5. Anzucht von je zwei Zelllinien des porcinen WT und DMDpigs über je acht Passagen und danach Differenzierung jeder Zelllinie bis zu Tag acht mit täglicher Dokumentation durch Fotoaufnahmen unter dem Lichtmikroskop (Ergebnis: Abbildung 3 & 5 des Papers I).
6. Charakterisierung der *in-vitro* Kulturen durch Myogenität, Proliferation und Differenzierungsgrad über acht Passagen hinweg mittels Immunfluoreszenzfärbung (IF) nach vorangehender Etablierung der Methode für einen Myosin, Desmin und Ki-67-Antikörper (Ergebnis: Abbildung 4 & 5 des Papers I).
7. Vergleich von Myogenität und Proliferation verschiedener Kulturen auf Unterschiede in Bezug auf WT vs. DMDpig, Muskeltyp, Alter der Tiere bei Probenentnahme und Entwicklung der Kulturen über mehrere Passagen hinweg mittels IF (Ergebnis: Abbildung 1 & 4 des Papers I).

-
8. Optimierung der WB-Methodik zum Protein-Nachweis von Dystrophin und Utrophin mit Testung und Etablierung verschiedener Dystrophin- und Utrophin-Antikörper auf deren Anwendbarkeit und Funktionalität in der Spezies Schwein (als Vorbereitung der Ergebnisse in Abbildung 5 & 8 des Papers I).
 9. Systematischer Test von myogenen Zelllysaten von WT und DMDpigs im Western Blot auf mögliche Unterschiede im Proteingehalt (Dystrophin & Utrophin) nach Alter der Tiere, Dauer der Differenzierung und Anzahl der Passagen vor Zellernte (Ergebnis: Abbildung 5 & 8 des Papers I).
 10. Auswahl und Zusammenfassung der Ergebnisse für die Veröffentlichung.
 11. Entwurf der Darstellungen für den Ergebnisteil.
 12. Verfassen des ersten Entwurfs des Manuskripts für die weitere Bearbeitung durch meine Koautoren.
 13. Fortlaufende Mitarbeit bei der Ergänzung der gewünschten Änderungen am Manuskript, beim Einreichungsprozess und beim Revisionsprozess.

1.2 Beitrag zu Paper II

Meinen persönlichen Beitrag an der Veröffentlichung „Nuclear Small Dystrophin Isoforms during Muscle Differentiation“ (Donandt et al. 2023) kann man zusammenfassend wie folgt darstellen:

1. Anzüchten von porcinen, murinen und humanen myogenen Zellkulturen bis hin zu Tag sechs der Differenzierung mit täglichem Ernten von Coverslips jeder Zelllinie und täglicher Ernte von Zellysaten je Zelllinie (als Vorbereitung der Ergebnisse in Abbildung 1 & 2 des Papers II).
2. Etablierung eines Protokolls für IF mit verschiedenen Dystrophin-Antikörpern in murinen, porcinen und humanen Myoblasten (als Vorbereitung des Ergebnisses in Abbildung 1 des Papers II).
3. Fixieren und IF von bewachsenen Coverslips (Reihenfärbung jeder der drei Spezies) mit anschließender Fotodokumentation am IF-Mikroskop (Ergebnis: Abbildung 1 des Papers II).
4. Extraktion und Separierung von Zellkernen zum restlichen Zellysat je Differenzierungstag und Spezies mit zuvor angepasster Methode (als Vorbereitung des Ergebnisses in Abbildung 2 des Papers II).
5. Anpassen des Protokolls für den WB zum Nachweis von Dystrophin in Zellkernen (als Vorbereitung des Ergebnisses in Abbildung 2 des Papers II).
6. Reihentest von murinen, humanen und porcinen Zellkernlysaten im WB je Differenzierungstag zum Nachweis der Entwicklung des Dystrophin-Gehalts in myogenen Zellkernen (Ergebnis: Abbildung 2 des Papers II).
7. Auswahl und Zusammenfassung der Ergebnisse für die Veröffentlichung und Entwurf der Darstellungen für den Ergebnisteil.
8. Verfassen des ersten Entwurfs des Manuskripts für die weitere Bearbeitung durch meine Koautoren.
9. Fortlaufende Mitarbeit bei der Ergänzung der gewünschten Änderungen am Manuskript, beim Einreichungsprozess und beim Revisionsprozess.

2. Einleitung: Ein translationales Großtiermodell für die Duchenne Muskeldystrophie

2.1 Die Duchenne Muskeldystrophie

Die Duchenne Muskeldystrophie (DMD) ist eine seltene X-chromosomal vererbte, progressiv verlaufende neuromuskuläre Erkrankung, welche sich durch eine starke fortschreitende Muskelschwäche mit tödlichem Verlauf äußert und fast nur Jungen betrifft. Die Erkrankung wird durch ein Defizit oder auch nur unzureichende Expression des Cytoskelett-Proteins Dystrophin verursacht, welches Kraft, Stabilität und Funktionalität der Muskelfasern ermöglicht (Birnkranz et al. 2018b).

DMD ist die am häufigsten auftretende seltene neuromuskuläre Erkrankung mit 1:3.600-6.000 Fällen (Duan et al. 2021; Fox et al. 2020). In Deutschland (D) wird von etwa 1.500-2.000 Betroffenen ausgegangen. Eine retrospektivische Studie ergab für das Jahr 2001 in D die höchste Inzidenz für DMD mit einem Fall pro 3.891 männlichen Lebendgeburten (Konig et al. 2019). Internationale Studien geben eine Prävalenz für DMD von 1:6.289 bzw. 1:5.128 an (Mendell et al. 2012; Moat et al. 2013; Ryder et al. 2017). In D gibt es für DMD-Patienten ein Patientenregister (TREAT-NMD: www.dmd-register.de), welches mit Stand Juli 2023 766 Patienten im Alter von 0 – 45 Jahren und mit genetisch bestätigter Diagnose DMD umfasste. Anhand dieser Daten konnte bestimmt werden, dass in D im Durchschnitt im Alter von 3 Jahren die ersten Symptome auftraten und die Diagnose DMD dann durchschnittlich im Alter von 3,5 Jahren gestellt wurde. Internationale Studien ergaben, dass sich erste Symptome im Durchschnitt schon ab 2,5 Jahren zeigten, aber die bestätigte Diagnose DMD durchschnittlich erst im Alter von 5 Jahren gestellt wurde (Hiebeler et al. 2023).

Bei der mildereren allelischen Form der Erkrankung, der Becker Muskeldystrophie (BMD), liegt ebenfalls eine Mutation im *DMD*-Gen vor. Dabei handelt es sich aber um eine sogenannte „in-frame Mutation“, bei der der Leserahmen erhalten bleibt (kein sog. „frameshift“). Somit werden verkürzte und damit partiell funktionelle Formen des Proteins Dystrophin exprimiert, was in Folge zu einem mildereren Phänotyp führt. Daher ist BMD die mildere Form der DMD, aber mit einer größeren Variabilität an Symptomen und deutlich langsamerem Verfall des Muskelgewebes (Bushby et al. 1993; Comi et al. 1994). Die Prävalenz von BMD liegt bei 1:20.000 (Moat et al. 2013).

2.1.1 Krankheitsbild und Verlauf

Innerhalb der ersten zwei Lebensjahre haben DMD-Patienten in der Regel - mit Ausnahme einer eventuellen unspezifischen Entwicklungsverzögerung - keine motorischen Einschränkungen. Erste motorische Probleme treten dann meist im Alter von 3 - 10 Jahren

in Form von Muskelschwäche beim Laufen, Aufstehen (Gowers-Manöver) und beim Treppensteigen auf (Birnbrant et al. 2018b). Teilweise zeigen die Jungen schon früh in der Entwicklung auch kognitive Einschränkungen oder erlernen das Sprechen schlechter als gleichaltrige Kinder (Ziegler et al. 2023). Gelegentlich wird die DMD im frühkindlichen Alter als Zufallsbefund nach der Diagnose einer deutlich erhöhten Kreatinkinase (CK-Werte) entdeckt (Hiebeler et al. 2023). Heutzutage werden 80 % aller Diagnosen über einen molekulargenetischen Test gestellt, sehr selten nur noch über den klassischen Weg der Muskelbiopsie (Hiebeler et al. 2023; Birnbrant et al. 2018b). Idealerweise sollten die Patienten spätestens nach Diagnosestellung an ein spezialisiertes Zentrum überwiesen werden, wo eine umfangreiche symptomatische Therapie und notwendige Folgeuntersuchungen (kardiologisch, orthopädisch, eventuell chirurgisch, endokrinologisch, urologisch, psychologisch, physiotherapeutisch und ernährungsberatend) angewiesen und gesteuert werden können (Birnbrant et al. 2018a).

Die meisten DMD-Patienten verlieren im Alter von 8 - 12 Jahren die Gehfähigkeit und haben erste erhebliche Veränderungen am Skelett (Skoliosen), nach der ersten Dekade lässt die Funktion der oberen Extremitäten nach. Ab dem Alter von ca. 15 Jahren wird meist eine nächtliche nicht-invasive Beatmung erforderlich. Ab dem 20. Lebensjahr wird vornehmlich eine 24-stündige, ggf. auch invasive Beatmung notwendig und damit steigt zunehmend das Risiko an kardinalen oder respiratorischen Komplikationen zu versterben (Walter et al. 2017). Die Lebenserwartung von DMD-Patienten lag vor einigen Jahren noch bei unter 20 Jahren, stieg aber inzwischen dank verschiedener – nicht-kausaler - Therapiemöglichkeiten auf bis zu über 40 Jahre an (Birnbrant et al. 2018c; Saito et al. 2017).

Histologische Färbungen der Skelettmuskulatur aus Muskelbiopsien von DMD-Patienten zeigten Entzündungsparameter, Hypertrophie der Muskelfasern und einen fettigen-fibrotischen Umbau der Muskulatur (Guiraud et al. 2015a; Gao et al. 2015), ebenso wie im Durchmesser kleinere, sich regenerierende Muskelfasern mit zentral-liegenden Zellkernen und immunhistochemisch das Fehlen von Dystrophin (Blake et al. 2002).

2.1.2 Genetik

Das Dystrophin-kodierende Gen (*DMD*) auf dem X-Chromosom ist mit ca. 2,5 Millionen Basenpaaren (Mb) und 79 Exons, entsprechend ca. 1-5 % des gesamten X-Chromosoms, das größte Gen des menschlichen Erbguts (Muntoni et al. 2003). Dystrophin wird hauptsächlich in Skelett- und Herzmuskulatur sowie im Gehirn exprimiert (Bies et al. 1992; Torelli et al. 1999).

DMD wird gonosomal-rezessiv vererbt. Ein deutlicher Phänotyp tritt bei weiblichen DMD-Patientinnen daher aufgrund der Inaktivierung eines X-Chromosoms nur selten auf (Duan et al. 2021). Meist sind die Mütter der DMD-Patienten Überträger, sogenannte Carrier, und werden erst nach der Befundung ihrer Söhne als DMD-Carrier diagnostiziert.

Selten wird bei ihnen erst dann z. B. eine Kardiomyopathie aufgrund von spezielleren Untersuchungen als DMD-Befund diagnostiziert (Ishizaki et al. 2018). In der Regel haben Konduktorinnen neben einer fakultativen Kardiomyopathie keine oder nur milde Symptome von DMD (Sarkozy et al. 2023).

Es sind mehr als 7.000 individuelle kausative Mutationen für DMD identifiziert worden, welche größtenteils in Form von Deletionen sowie Duplikationen und Punktmutationen vorkommen (Ziegler et al. 2023). Die individuellen Mutationen fallen in zwei Kategorien: Große Mutationen mit einem oder mehreren beteiligten Exon(s), die ca. 75 % der Mutationen ausmachen, und kleine Mutationen, sogenannte Nonsense-Mutationen, die weniger als ein Exon beinhalten (Bladen et al. 2015). Der Bereich mit dem höchsten Anteil an Mutationen liegt zwischen Exon 45–55, weshalb erste Gentherapieansätze auch genau für diesen Bereich entwickelt wurden, um möglichst viele DMD-Patienten erreichen zu können (Nakamura et al. 2017; Walter et al. 2017).

2.1.3 Dystrophin und der DMD-Pathomechanismus

DMD wird durch *DMD*-Mutationen verursacht, welche in der Regel zu einem vorzeitigen Stopcodon und damit zum Fehlen von Dystrophin führen. Der Verlust des Dystrophin-Proteins verhindert eine stabile Verbindung zwischen Sarkolemm und Cytoskelett der Muskelzelle, wodurch die Stabilität und Funktionalität der Muskelfaser beeinträchtigt werden. Dystrophin verbindet dabei als wesentliche Komponente des sog. Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes (DGC) das cytoskelettäre F-Actin mit der extrazellulären Matrix (Duan et al. 2021). Das vom *DMD*-Gen kodierte Dystrophin-Protein ist rod-shaped und besteht aus vier Domänen: der N-terminalen Aktin-Bindungsdomäne, einer stabförmigen Domäne bestehend aus 24 Spektrin-ähnlichen Wiederholungen und vier Verbindungs- (oder Scharnier-) Domänen, einer Cystein-reichen Domäne, die mit Dystroglycan- und Sarkoglycan-Komplexen interagiert, und der C-terminalen Domäne, die mit dem Syntrophin-Komplex und Dystrobrevin interagiert (Campbell 1995) (**Abbildung 1**).

Es wird angenommen, dass der DGC während der Muskelkontraktion als Membranstabilisator und/oder als Überträger von Signalen von der extrazellulären Matrix zum Muskelcytoplasma über intrazelluläre Signalmoleküle fungiert. Der Verlust von Dystrophin führt dazu, dass die Membran aufgrund mechanischer oder hypoosmotischer Belastung undicht wird. Folglich wird die Ca^{2+} -Permeabilität erhöht und verschiedene Ca^{2+} -abhängige Proteasen wie Calpain werden aufgrund des Dystrophin-Mangels aktiviert (Nakamura et al. 2011). Dadurch wird der Muskel einem permanenten Stress ausgesetzt, was ihn letztlich verletzt und somit eine Entzündungsreaktion hervorruft.

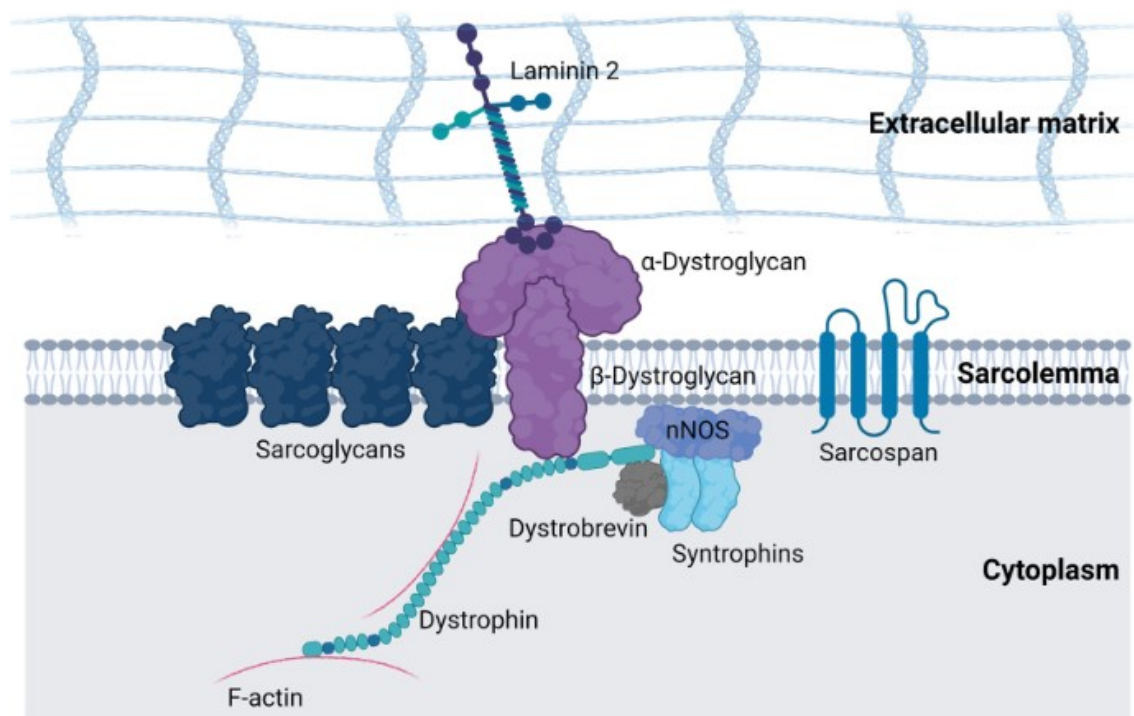


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes. (Stirm et al. 2022).

Das *DMD*-Gen kodiert verschiedene Protein-Isoformen (Dystrophin-Protein (Dp) 427, Dp 260, Dp 140, Dp 116, Dp 71, Dp 40) (Blake et al. 2002; Doorenweerd et al. 2017). Es gibt einen Zusammenhang zwischen den Dystrophin-Isoformen Dp 140 und Dp 70 mit der Ausprägung des kognitiven Phänotyps bei DMD-Patienten (Taylor et al. 2010) und die Schwere der kognitiven Einschränkung steht in positiver Korrelation zum Fortschritt des motorischen Phänotyps in der kindlichen Entwicklung (Chesshyre et al. 2022). Jedoch bedarf das Verständnis der genauen Auswirkungen der verschiedenen *DMD*-Mutationen auf die Expression der einzelnen Dystrophin-Isoformen und den Phänotyp der DMD noch weiterer Forschung.

2.1.4 Utrophin

Bei Utrophin handelt es sich um ein zu Dystrophin homologes Protein, welches funktionell partiell redundant zu Dystrophin vorkommt. Utrophin hat wie auch Dystrophin strukturell ähnliche N-terminale, Cystein-reiche und C-terminale Domänen (Love et al. 1989) und beide Proteine teilen viele Bindungspartner, wie β-Dystroglycan, α-Dystrobrevin-1 und F-Actin (Ervasti 2007). Utrophin und Dystrophin werden jedoch unterschiedlich exprimiert: Utrophin wird in der Embryonalphase am Sarkolemm exprimiert und nach der Geburt durch Dystrophin ersetzt (Schofield et al. 1993). Im Erwachsenenalter wird Utrophin in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, wie Utrophin (Isoform A) an den neuromuskulären Endplatten der Muskeln (Nguyen et al. 1991) und Utrophin (Isoform B) in den Endothelzellen (Weir et al. 2002). Nach Verletzungen wird die

Utrophin (Isoform A)-Expression am Sarkolemm in regenerierenden Myofasern wieder aktiviert (Guiraud et al. 2015b).

In Abwesenheit von Dystrophin ist die Utrophin (Isoform A)-Expression am Sarkolemm in Mausmodellen für DMD (*mdx*-Maus) als Teil des Regenerationsprozesses hochreguliert (Helliwell et al. 1992). *Mdx*-Mäuse, die Utrophin im Vergleich zum WT dreibis vierfach überexprimieren, entwickeln keine Muskeldystrophie (Tinsley et al. 1998). Auch zeigt eine Überexpression von Utrophin im murinen Gewebe keine Toxizität (Fisher et al. 2001). Des Weiteren haben Studien gezeigt, dass eine frühe Zugabe von Utrophin in *mdx*-Mäusen pathologische Veränderungen verhindern kann (Squire et al. 2002; Guiraud et al. 2015b). Aufgrund dieser Ähnlichkeit und dieser vielversprechenden Ergebnisse spielt das Protein Utrophin bei der Therapieentwicklung für DMD eine wichtige Rolle (Walter 2018).

2.1.5 Therapiemöglichkeiten

DMD kann bislang nicht ursächlich therapiert werden (Ziegler et al. 2023). Dennoch hat sich die Lebenserwartung und Lebensqualität der DMD-Patienten in den letzten Jahren deutlich verbessert. Neben der möglichst frühen Diagnosestellung werden Patienten mit einem koordinierten multidisziplinären Versorgungsansatz behandelt, um Krankheitsmanifestationen und möglichen Komplikationen optimal entgegenzuwirken. Eine Betreuung durch auf DMD spezialisierte Zentren in Kooperation mit Neurologen, Physiotherapeuten, Lungenfachärzten, Kardiologen, ggf. Chirurgen, Orthopäden sowie psychosozialer und ernährungstherapeutischer Beratung ermöglicht eine deutliche Verbesserung des Leidens von DMD-Patienten. Die Behandlung mit Glucocorticoiden, überwiegend ab dem 5. Lebensjahr, sowie in späteren Erkrankungsstadien eine Heimbeatmung komplementieren die Situation aktuell für die Patienten (Birnkrant et al. 2018b; Birnkrant et al. 2018a; Birnkrant et al. 2018c).

In den letzten Jahren gab es nun verschiedene neue Therapieansätze, um DMD erstmals auch kausal zu behandeln. Dabei gibt es drei Strategien: Die Wiederherstellung der Dystrophin-Expression durch eine Gen-Regulation, Verfahren der Gen-Editierung, z. B. durch Einsatz der „Genschere“ (CRISP/Cas9-Technologie), sowie Gen-Addition, durch z. B. Einbringen einer funktionsfähigen Version des *DMD*-Gens mit Hilfe von Adenoassoziierte Dependoparvoviren (AAV) -Vektoren. Vor allem die Genadditionstherapie mit einem Mini-/Mikrodystrophin bietet sich für DMD an, weil man zum einen das 2,5 Mb große *DMD*-Gen aufgrund seiner Größe nicht in klassischen AAV-Vektoren verpacken kann und zum anderen von der milderen BMD weiß, dass auch große Mutationen des *DMD*-Gens einen milden Verlauf der Erkrankung verursachen können, solange der Leserahmen des *DMD*-Gens erhalten bleibt (eine sog. „in-frame“ Mutation) (Deng et al. 2022). Es befinden sich daher vier solcher *DMD*-Transgenvarianten in der klinischen Prü-

fung (Ziegler et al. 2023). Eine davon erhielt im Juni 2023 eine bedingte Zulassung („conditional approval“) der U.S. Food and Drug Administration (FDA) mit der Auflage, weitere Studienergebnisse über die Wirksamkeit liefern zu müssen. Elevidys von Sarepta ist damit die erste für DMD zugelassene Gentherapie, allerdings ist sie vorerst nur für vier- und fünfjährige noch gehfähige Patienten als einmalige Behandlung zugelassen und enthält eine Kontraindikation bei Patienten mit einer Deletion der Exons 8 und/oder 9 des *DMD*-Gens (U.S. Food and Drug Administration, 2023).

Des Weiteren gibt es verschiedenen Exon-Skipping und „read-through“-Therapieansätze für DMD. Exon-Skipping-Präparate ermöglichen eine Dystrophin-Expression auf mRNA-Ebene, indem synthetische Antisense-Oligonukleotide (AON) spezifisch an ein gezieltes Exon binden, was zum Überspringen („skipping“) beim Ablesen des geblockten Exons führt. Eine Leserahmenverschiebung des *DMD*-Gens wird somit unter Verlust eines zusätzlichen Exons in eine „in-frame“-Deletion ohne Leserahmenverschiebung umgewandelt (Aartsma-Rus et al. 2009). Es gab verschiedene AON-Wirkstoffe in der klinischen Prüfung, jedoch haben diese ihre klinischen Endpunkte nicht oder nur unzureichend erreicht. Daher gibt es nun neuere Präparate in klinischen Prüfungen, welche weiterentwickelt wurden, um durch Peptidkonjugation eine bessere Wirksamkeit in der quergestreiften Muskulatur zu erzielen (Ziegler et al. 2023).

Die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) hat das oral-einzunehmende Medikament TranslarnaTM (Ataluren) für DMD-Patienten mit einer Nonsense-Mutation im Jahr 2014 zugelassen (European Medicines Agency, 2014). Allerdings ist die „read-through“-Therapie, die ein Stopcodon überliest und damit zu einer partiellen Dystrophinexpression führt, nur für ca. 11% der DMD-Patienten ab einem Alter von zwei Jahren und erhaltener Gehfähigkeit einsetzbar (McDonald et al. 2017; McDonald et al. 2022).

Daneben gibt es intensive Bemühungen eine DMD-Therapie zu entwickeln, die die dystrophe Pathologie verringert und Muskelmasse und -funktion verbessert. Bei diesen symptomatischen Therapieansätzen sollen mit anti-inflammatorischen, antioxidativen oder anti-fibrotischen Wirkstoffen Sekundärkomplikationen der DMD verhindert werden (Ziegler et al. 2023). Corticosteroid-Therapien verbessern zwar die Muskelfunktion und verlängern die Gehfähigkeit der Patienten, jedoch haben sie eine Vielzahl an Nebenwirkungen und können DMD nicht kausal therapieren (Zhang et al. 2021; Angelini et al. 2012). Synthetische Steroide neuerer Generationen wie Vamorolone sind vielversprechende zukünftige Wirkstoffe (Hoffman et al. 2019), die unabhängig von Dystrophin und der zugrunde liegenden Mutation wirken. Weitere hoffnungsvolle Therapieansätze für DMD sind auch Inhibitoren von NF- κ B als Entzündungshemmer (Vandewalle et al. 2018; Finanger et al. 2019), anti-Myostatin Antikörper, um das Muskelwachstum anzuregen (Murphy et al. 2010; Wagner et al. 2020), und anti-CTGF-Antikörper gegen fibrotisches Wachstum (Morales et al. 2013). Die Hoch-Regulierung von Utrophin als Ersatztherapie für fehlendes Dystrophin ist ein weiterer aussichtsreicher Therapieansatz in Tierversu-

chen (Muntoni et al. 2019; Verhaart et al. 2019), dessen Wirksamkeit in humanem Gewebe bisher leider nicht bewiesen werden konnte (Markati et al. 2022). Die Givinostat Therapie (ein Histon-Deacetylase-Inhibitor) wurde bereits für DMD von der FDA zugelassen, nachdem sich der Muskelanteil gegenüber fibrotischem Gewebe in Muskelbiopsien nach der oralen Gabe des Medikaments erhöht hat (Deng et al. 2022).

Für BMD hat das Präparat Follistatin als Inhibitor des Myostatin-Signalwegs vielversprechende Ergebnisse geliefert, was es auch für DMD zu einem interessanten Medikament machen könnte (Mendell et al. 2015; Al-Zaidy et al. 2015).

Schlussendlich sind zwar eine Vielzahl an Medikamenten-Studien mit vielfältigen und vielversprechenden Ansätzen in verschiedenen Prüfphasen, aber keine Medikation kann DMD aktuell heilen. Die großen Hemmschwellen für den Durchbruch einer erfolgreichen DMD-Therapie sind neben der Größe des *DMD*-Gens die Verträglichkeit der Therapie, der richtige Zeitpunkt der Medikation, die Dosierung sowie die Häufigkeit der Medikamentengabe und die tatsächliche Wirksamkeit mit einer Verbesserung der klinischen Symptome (Markati et al. 2022; Ziegler et al. 2023).

2.2 Tiermodelle für die Duchenne Muskeldystrophie

Für DMD gibt es eine relativ große Auswahl an natürlichen und künstlich hergestellten Säugetier-Modellen, wie z. B. Tiermodelle von Maus, Ratte, Kaninchen, Katze, Affe, Hund und Schwein (Nakamura et al. 2011). Für die Therapieentwicklung ebenso wie für die Grundlagenforschung sind gute Tiermodelle unerlässlich. Tiermodelle sind von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien, um das Fortschreiten einer Krankheit zu verhindern und ihre pathologischen Mechanismen besser zu verstehen (Wells 2018). Auch Sicherheits- und Wirksamkeitsprognosen über neue Therapeutika erfordern zuverlässige Tiermodelle, die die dargestellte Situation am Patienten nachstellen können sowie Hinweise auf Biomarker, physiologische Prozesse, pathologische Veränderungen und die Reaktion auf therapeutische Maßnahmen geben können (Aigner et al. 2010).

In den letzten Jahren haben sich hauptsächlich drei Tiermodelle für die Forschung an DMD manifestiert: erstens die „X-Chromosom-linked Muskeldystrophie-Maus“ („*mdx*-Maus“), zweitens der „Golden Retriever Muskeldystrophie Hund“ („GRMD-Hund“) und zum Dritten das von unserer Arbeitsgruppe neu entwickelte Schweinemodell mit Deletion des Exon 52 im *DMD*-Gen („DMDpig“).

2.2.1 Murine Modelle

Bei der *mdx*-Maus besteht eine spontan entstandene Nonsense-Mutation in Exon 23 des *DMD*-Gens (Bulfield et al. 1984). Dieses Modell wurde seit über 30 Jahren umfangreich charakterisiert und untersucht, auch weil sich Nagetiere einfach halten und reproduzieren lassen und weil Mausmuskeln *in-vitro* unkompliziert zu bearbeiten sind (Zaynitdinova et al. 2021). Obwohl die *mdx*-Maus ein gutes biomedizinisches Modell für DMD ist, zeigen diese Mäuse keine eindeutigen klinischen Anzeichen einer Muskeldystrophie (Wells 2018). Der Phänotyp der *mdx*-Maus ist viel milder als bei DMD-Patienten (Bulfield et al. 1984). Histopathologische Merkmale von DMD, wie eine Reduzierung von Muskelfasern, Fibrose- und Fettablagerungen im Muskelgewebe sowie Anzeichen von Muskelregeneration, finden sich nur im Zwerchfell der *mdx*-Maus, aber nicht in ihrer Skelettmuskulatur (Fukada et al. 2010). Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen haben *mdx*-Mäuse eine leicht verkürzte Lebenserwartung. Ältere *mdx*-Mäuse neigten zusätzlich dazu, Muskeltumore zu entwickeln, die der menschlichen Form des alveolären Rhabdomyosarkoms ähnelten. Diese Form von Tumor wurde bisher bei Wildtyp-Mäusen nicht beobachtet (Chamberlain et al. 2007).

Es wurden zudem mehrere andere *mdx*-Maus-Stämme mit patientenrelevanten Mutationen durch Gen-Targeting erzeugt (Yucel et al. 2018), einschließlich einer *mdx*-Maus mit einer Deletion von *DMD* Exon 52 (Araki et al. 1997). Jedoch zeigten auch diese

mdx-Mäuse mit Dystrophin-Mangel nur einen geringen Phänotyp und eine leicht verkürzte Lebensdauer. Eine mögliche Kompensation des fehlenden Dystrophins durch die Hochregulierung seines Homologs Utrophin in *mdx*-Mäusen könnte zu dem geringeren Phänotyp führen (Deconinck et al. 1997). Interessanterweise verschlechtern Inaktivierungen von z. B. Utrophin (*Utrn*), α -Dystrobrevin (*Dtna*), α 7-Integrin (*Itga7*) oder myogene Differenzierung 1 (*Myod1*) den Phänotyp des jeweiligen *mdx*-Mausmodells (Yucel et al. 2018). Allerdings kommen diese doppelten Knockouts beim Menschen nicht vor und daher sind diese Tiermodelle für die DMD-Forschung limitiert (Wells 2018).

Das breite Spektrum an *mdx*-Mausmodellen brachte große Fortschritte für das Verständnis der DMD-Krankheitsmechanismen und ermöglichte zahlreiche Studien neuer Therapieansätze für die präklinische Forschung. Allerdings sind aufgrund der Schwachpunkte dieses DMD-Tiermodells zusätzlich Großtiermodelle für translationale Studien erforderlich (Stirm et al. 2022).

2.2.2 Canine Modelle

Es gibt mehrere DMD-Hundemodelle mit natürlichem oder künstlichem Dystrophinverlust: Am bekanntesten und weltweit am häufigsten für die DMD-Forschung eingesetzt wird der Golden Retriever Muskeldystrophie Hund (GRMD), der im *DMD*-Gen eine Punktmutation an der 3'-Spleißstelle von Intron 6 aufweist und dadurch Exon 7 übersprungen wird, wodurch ein Stopcodon in Exon 8 vorliegt (Sharp et al. 1992). Dies führt zu einer Dystrophindefizienz (Kornegay et al. 1988). GRMD-Hunde haben, verursacht durch eine ausgeprägte Muskelatrophie und -Fibrose, einen deutlichen progressiven Phänotyp, wie z. B. Wachstumsverzögerungen, Muskelschwäche und Gangstörungen. Bei diesen Hunden sind die CK-Werte deutlich erhöht (Valentine et al. 1988), aber sie zeigen klinische Symptome einer Kardiomyopathie frühestens im Alter von 2,5 Jahren, wodurch die Eignung als DMD-Tiermodell eingeschränkt ist (Guo et al. 2019).

Darüber hinaus gibt es eine Beagle-basierte X-chromosomale Muskeldystrophie bei Hunden in Japan (CXMDJ). Sie weisen den gleichen Phänotyp wie GRMD-Hunde auf, aber die kleineren Hunde sind aufgrund ihrer geringeren Größe und Gewichts günstiger zu halten (Shimatsu et al. 2003; Shimatsu et al. 2005). Bei diesen Hunden sind keine dystrophischen Veränderungen des Myokards bis zum Alter von 13 Monaten erkennbar, dafür zeigen sie bereits im Alter von vier Monaten vakuoläre Degenerationen der kardialen Purkinje-Fasern (Yugeta et al. 2006; Echigoya et al. 2017; Urasawa et al. 2008).

Es gibt zahlreiche weitere DMD-Hundemodelle (Kornegay et al. 2012): ein hier noch erwähnenswertes canines Modell ist der Cavalier King Charles Spaniel (CKCS-MD) mit einer Missense-Mutation an der 5'-Spleißstelle von Exon 50 des *DMD*-Gens mit daraus resultierender Deletion von Exon 50. Durch *in-vitro* Exon-Skipping von Exon 51 mit AONs konnte ein intakter Leserahmen wiederhergestellt werden, der zu einer Dystrophin-Expression im Western Blot von behandelten myogenen Zellen führte (Walmsley et

al. 2010). Dieses Tiermodell könnte für einen gewissen Anteil an DMD-Patienten (mit Deletion von Exon 50) in der präklinischen Forschung eingesetzt werden.

Alle DMD-Hundemodelle haben ähnliche Limitationen: Die einzelnen Tiere variieren stark im individuellen Phänotyp und viele dieser Hunde sterben aufgrund der Erkrankungsschwere, bevor sie das Alter von sechs Monaten erreichen. Das erschwert es, eine ausreichende Anzahl an Tieren für Studienergebnisse mit klarer statistischer Signifikanz zu erzeugen (Wells 2018). Außerdem ist die Reproduktion von Hunden aufwendig und teuer. Hunde sind aus ethischer Sicht als Versuchstiere problematisch, weil sie als Haustiere und nicht als landwirtschaftliche Nutztiere wahrgenommen werden (Kornegay et al. 2011). Zusammenfassend sind Hundemodelle mit *DMD*-Mutationen vielversprechende Tiermodelle, jedoch mit gewissen Limitationen in Bezug auf ihre Anwendbarkeit in der präklinischen Forschung.

2.2.3 Porcines Modell: DMDpig

Unsere Forschungsgruppe entwickelte mithilfe von Gen-Targeting ein skalierbares Großtiermodell für DMD, das DMDpig (**Abbildung 2**). Bei diesem Modell wurde das Exon 52 des porcinen *DMD*-Gens deletiert, weshalb die Tiere kein Dystrophin produzieren (Klymiuk et al. 2013). Mutation im Bereich von Exon 45 – 55 sind die Hotspot-Regionen für DMD verursachende Mutationen auf dem X-Chromosom und die Deletion von Exon 52 ist eine der häufigsten Mutationen, die DMD verursachen (Aartsma-Rus et al. 2006). Eine potenzielle Therapie für DMD in diesem Bereich könnte einem großen Anteil der Betroffenen helfen (Muntoni et al. 2003; Stirm et al. 2023).



Abbildung 2: Vier Monate altes DMDpig (links: #7074) mit seinem WT-Wurfbruder (rechts: #7072) mit im Vergleich deutlichem Größen- und Muskelmassenunterschied (Gewichtsunterschied).

DMDpigs haben aufgrund ihrer Dystrophindefizienz und daraus resultierenden degenerativen Veränderungen der Skelettmuskulatur eine fortschreitende Muskelschwäche, Muskelatrophie, eingeschränkte Beweglichkeit und einen verminderten Bewegungsdrang

(Stirm et al. 2021). Histologische Untersuchungen ihres Muskelgewebes zeigten einen progressiven Verlauf von fibrotischem und entzündlichem Umbau der Skelettmuskulatur sowie eine fortschreitende Kardiomyopathie (Klymiuk et al. 2013; Stirm et al. 2021).

Schweinmodelle sind eine bevorzugte Option für translationale Studien, da diese Tiere u. a. in Körpergröße und Physiologie dem Menschen sehr ähnlich sind (Lunney et al. 2021). Daher sind sie sehr gut geeignet, eine neue Therapie auf mögliche Nebenwirkungen und Wirksamkeit zu testen, bevor sie beim Menschen angewendet wird (Wells 2018).

Das Schweinmodell für DMD ist in der Literatur inzwischen umfangreich beschrieben (Stirm et al. 2022; Klymiuk et al. 2013; Stirm et al. 2021) und ermöglichte bereits erste Vergleichsstudien für verschiedene therapeutische und diagnostische Ansätze. Ein CRISPR/Cas9-basierter Ansatz zur Wiederherstellung eines intakten Leserahmens bei DMDpigs wurde erfolgreich *in-vivo* getestet (Moretti et al. 2020) und eine Methode zur multispektralen opto-akustischen Tomographie als neuem nicht-invasivem bildgebendem Biomarker zur Beurteilung des DMD-Krankheitsverlaufs (Regensburger et al. 2019) konnte an diesem Modell validiert werden (Stirm et al. 2021). Auch die Anwendung von Exon-Skipping wurde an diesem *in-vivo* Modell erfolgreich etabliert und anhand der genveränderten Tiere können nun die Langzeitwirkung und -Wirksamkeit von Exon-Skipping in einem Großtiermodell untersucht werden (Stirm et al. 2023).

3. Darstellung des Forschungsvorhabens

Nachdem unsere Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem Team von Herrn Prof. Eckhard Wolf vom Genzentrum der LMU München das translationale Großtiermodell DMDpig entwickelt hat (Klymiuk et al. 2013), sollte als nächster Schritt des Projekts neben dem *in-vivo* Modell auch ein *in-vitro* Modell für das DMDpig etabliert werden. Ein valides Zellkulturmodell ist für ein Tiermodell – besonders Großtiermodell - aus Kosten-, Effizienz- und Effektivitätsgründen für die präklinische Forschung unabdingbar; speziell aufgrund der geringen Patientenfallzahlen bei seltenen Erkrankungen wie der DMD. Zudem machte das 3R-Prinzip für Tierversuche ein Zellkulturmodell notwendig. Dessen Vorsatz ist es, Tierversuche zu vermeiden („Replacement“) und die Anzahl der Versuchstiere („Reduction“) sowie ihr Leiden durch Tierversuche („Refinement“) auf das unerlässliche Maß zu reduzieren.

Unser Anspruch an ein „valides Zellkulturmodell“ für das DMDpig war eine allzeitige Wiederholbarkeit, eine gleichbleibende Qualität der Zellkulturen und eine gute Charakterisierung mit validen und einfach messbaren Read-Outs, um physiologische und pathologische Vorgänge der DMD untersuchen sowie Wirkungsweisen von möglichen DMD-Therapieansätzen vor einer *in-vivo* Testung *in-vitro* testen zu können.

Parallel dazu sollte eine Muskelbank mit Proben von DMDpigs, den zugehörigen Wildtyp-Geschwistern und weiblichen DMDpig Carriern angelegt werden, um auch bei größer angelegten Versuchsreihen für die präklinische Forschung ausreichend Probenmaterial für mehrere Versuchsreihen am Standort vorrätig lagernd zu haben.

Nachdem das *in-vivo* Tiermodell DMDpig den humanen Phänotyp hervorragend abbildet, wollten wir wissen, ob dies auch für unser Zellkulturmodell gilt. Dazu verglichen wir unser *in-vitro* Modell mit den beiden in der präklinischen DMD-Forschung hauptsächlich verwendeten Zellkulturmodellen (human & murin) während der Differenzierungsphase.

Das *DMD*-Gen kodiert für mehrere Dystrophin-Isoformen. Eine weitere Fragestellung war, inwiefern unser Zellkulturmodell geeignet ist, eventuelle Isoform-spezifische Funktionen zu untersuchen. Dabei wollten wir insbesondere die Muskeldifferenzierung untersuchen, um zu verstehen, ob es hier - ähnlich wie in Neuronen - potenziell wichtige Rollen von Dystrophin-Isoformen gibt, die entsprechend potenziell wichtig für die DMD-Pathogenese sind und folglich bei Therapieansätzen in Erwägung gezogen werden sollten.

4. Ergebnisse

Insgesamt ist die Publikation „Isolation and Characterization of Primary DMDpig Muscle Cells as an *in-vitro* Model for Preclinical Research on Duchenne Muscular Dystrophy“ (Donandt et al. 2022) als Grundlage für die nachfolgenden *in-vitro* Forschungsprojekte am translationalen Großtiermodell DMDpig einzuordnen. Diese Ergebnisse ermöglichen eine verbesserte Anwendung des Tiermodells für die präklinische Forschung gemäß dem 3R-Prinzip für Tierversuche. Sie bieten eine Grundlage, physiologische und pathologische Vorgänge der DMD besser zu verstehen und Therapieansätze *in-vitro* auf Ihre Wirkungsweise, Toxizität und Wirksamkeit untersuchen zu können, bevor diese *in-vivo* am Tiermodell getestet werden.

Das Paper „Nuclear Small Dystrophin Isoforms during Muscle Differentiation“ (Donandt et al. 2023) ist eine Veröffentlichung von Studienergebnissen zur Expression von Dystrophin-Isoformen während der Differenzierungsphase in verschiedenen Spezies. Es verglich das DMDpig-Zellkulturmodell mit humanen und murinen Zellkulturen, woraus sich interessante und wertvolle Informationen über die Anwendbarkeit von den *in-vitro* Tiermodellen Maus bzw. Schwein für die präklinische DMD-Forschung ergaben.

4.1 Paper I

Komplementierend zum translationalen Großtiermodell DMDpig wurde von uns ein Zellkulturmodell für das DMDpig etabliert und charakterisiert. Da zu Beginn dieses Projekts die Tiere sehr empfindlich waren und daher oftmals früh bzw. unerwartet starben (Stirm et al. 2021), benötigte diese Aufgabenstellung einen gewissen Zeitrahmen. Die Zucht mit DMDpig-Cariern als Muttertiere anstelle des Klonens der DMDpigs ermöglichte eine sehr viel höhere Anzahl an lebenden DMDpigs; zudem waren diese Tiere widerstandsfähiger und überlebten mit entsprechendem Management länger (Stirm et al. 2021).

Insbesondere in Bezug auf die ausreichende Differenzierung der porcinen Zellkulturen gab es zu Beginn Schwierigkeiten, was aber in der Literatur ein bereits bekanntes Problem war (Sebastian et al. 2015). Anfangs sollte eine möglichst lange Differenzierungsphase (bis zu 45 Tagen) erzielt werden, um ausreichend Myotuben in den Kulturen zu erhalten. Dieses zeitintensive Protokoll, mit Laufzeiten über mehrere Wochen bis zur Zellernte, war sehr aufwendig und zeitraubend. Ein weiteres Problem war ein nur unzureichender bis kein Proteinnachweis von Dystrophin im WB von Lysaten aus porcinen WT-Zellkulturen. Der erfolgreiche Nachweis des Proteins Dystrophin im WT – dessen Verlust ursächlich für die Erkrankung DMD ist (Birnkranz et al. 2018b) - ist jedoch unabdingbar für die erfolgreiche Etablierung einer validen Zellkulturmethode. Nur dann können in präklinischen Vorversuchen am *in-vitro* Modell die therapeutische Wiederherstellung von Dystrophin in Proben von erkrankten Tieren nachgewiesen, gemessen und beurteilt werden. Diese Problematik erforderte, bisherige Methoden für das Anlegen und

Anzüchten von porcinen Zellkulturen und den Proteinnachweis von Dystrophin grundlegend zu hinterfragen und jeden einzelnen Vorgang einzeln zu untersuchen und ggf. neu zu etablieren. Dies geschah auf Basis einer Gradienten-Methode zur Extraktion von Satellitenzellen aus porcinem Muskelgewebe vom Forschungsinstitut für Nutztierbiologie in Dummerstorf (Mau et al. 2008; Metzger et al. 2020). Es wurden darauf aufbauend Protokolle etabliert, um porcine Muskelbiopsien zu entnehmen, aufzubereiten (Aufblöcken für Muskelschnitte, Kryoreserven einlagern, Proben für Atmungsketten einlagern) und eine primäre Zellkultur, gewonnen aus Satellitenzellen, anzulegen (vgl. Methodenteil und Abbildungen 2 von Paper I (Donandt et al. 2022)). Dabei wurden verschiedene Muskeltypen verwendet (M. masseter, M. semitendinosus, M. biceps femoris und M. triceps brachii) (**Abbildung 3**). Ein Vergleich der daraus gewonnen Zelllinien hinsichtlich möglicher Unterschiede zwischen einzelnen Muskeltypen, dem Alter der Tiere bei der Biopsie und der Anzahl der Passagen *in-vitro* ergab keine wesentlichen Unterschiede zwischen diesen Faktoren (Donandt et al. 2022).

Insgesamt wurde Probenmaterial von DMDpigs und mindestens einem zugehörigen männlichen Wurfgeschwister als Kontrolltier im Alter von wenigen Tagen (jünger als eine Woche), einigen Wochen (vier und acht Wochen), drei und neun Monaten (nach Eintritt der Geschlechtsreife) in der Muskelbank des FBI eingelagert.

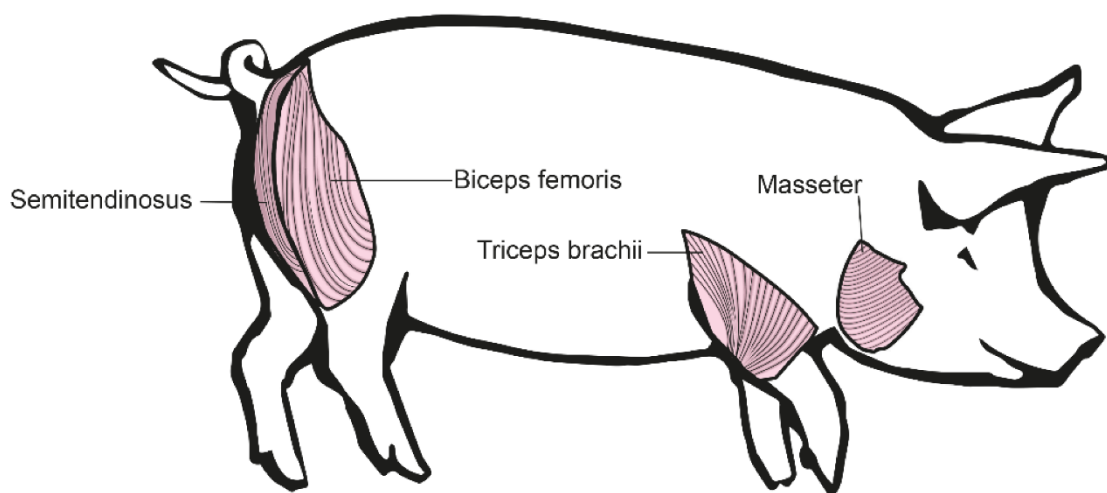


Abbildung 3: Verschiedene Muskeltypen wurden für die Muskelbank des DMDpigs verwendet. (Donandt et al. 2022).

Die mit diesen Protokollen entnommenen und verarbeiteten Muskelbiopsien hatten über acht Passagen hinweg eine knapp 70-90 %ige Myogenität (Anteil der Muskelzellen gegenüber der Gesamtzellzahl) und einen über 20-40 %igen Proliferationsanteil der myogenen Zellen (**Abbildung 4**) (Donandt et al. 2022).

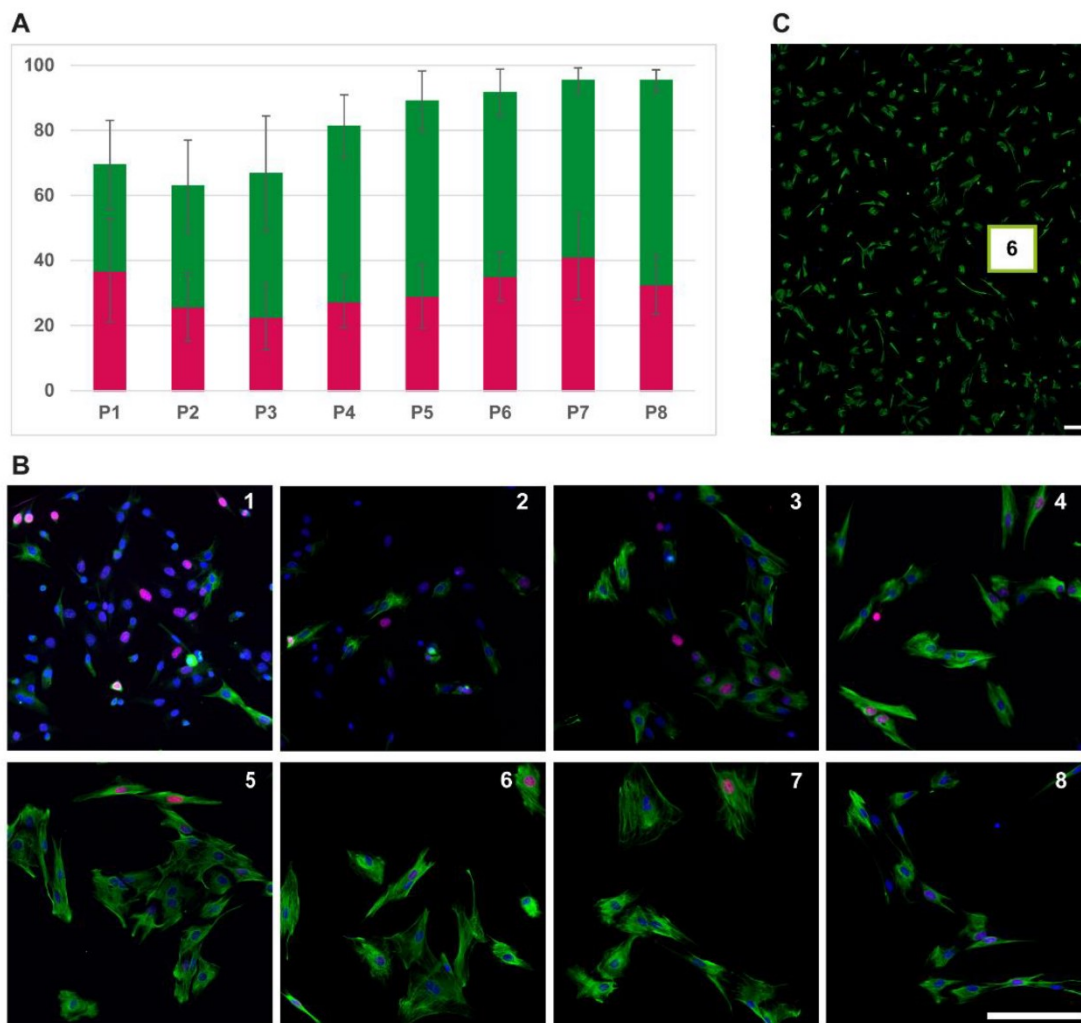


Abbildung 4: Proliferation: (A) Prozentualer Anteil an Myoblasten (Desmin positive Zellen: grün) über 8 Passagen und Proliferationsniveau dieser Myoblasten (positive für Ki-67: pink) mit Standardabweichung, (B) Beispielbild für ein Übersichtsfoto, (C) Zellkultur eines DMDpigs (m. biceps femoris) über 8 Passagen. Maßstableisten 200 μm (Donandt et al. 2022).

Der Nachweis der Proteine Dystrophin, Utrophin, Desmin, Myosin, Fibronectin und Ki-67 kann als Read-out für potenzielle Therapieansätze in der präklinischen Forschung für DMD genutzt werden. Das Protein Fibronectin wirkt *in-vitro* katalysierend auf das Wachstum und die Differenzierungsfähigkeit von porcinen Myoblasten (Donandt et al. 2022).

Die Methode des Western Blots (ursprünglich ausgehend vom Protokoll der Diagnostikabteilung des FBIs) wurde weiterentwickelt, um Volllängen-Dystrophin im Extrakt der DMDpig Zellkulturen nachweisen zu können. Ein systematischer Test von Zelllysaten aus Myotuben verschiedener porciner WT-Zelllinien ergab, dass die Differenzierung über vier bis sechs Tage ausreichend ist, um Dystrophin im Western Blot nachzuweisen (**Abbildung 5**) (Donandt et al. 2022).

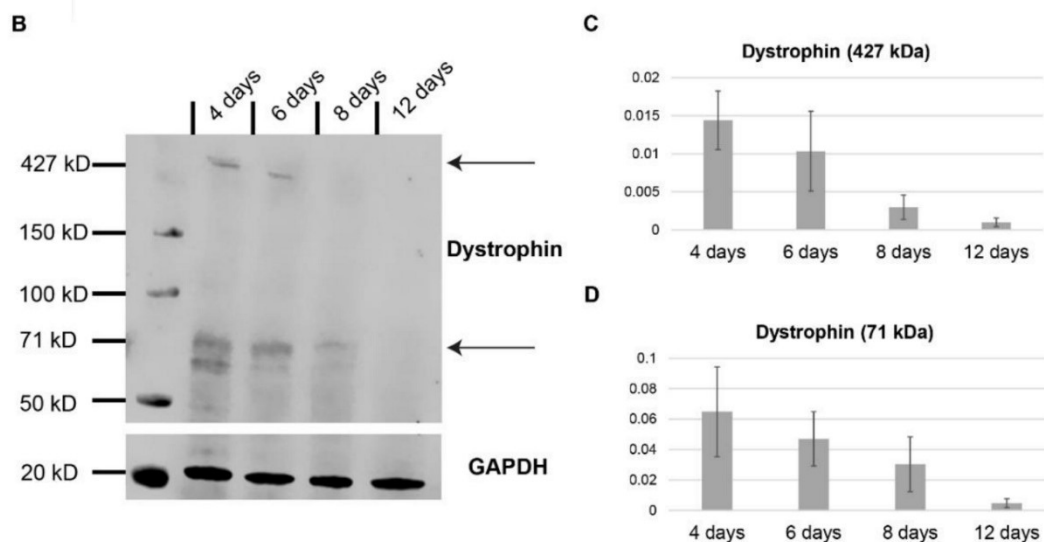


Abbildung 5: Differentiation von porcinen Myoblasten und Dystrophin Expression: Die Anzahl der Myotuben ist zwischen Tag 3-6 am höchsten und danach sinkt das Dystrophin-Level ab Tag 6 mit der Anzahl an Myotuben. (B) Der Western Blot zeigt die Expression von Dystrophin in porcinen WT-Zellkulturen. (C) Quantifizierung von Volllängen Dystrophin (427 kDa) und (D) der 71 kDa Isoform. (Donandt et al. 2022).

Um das Tiermodell DMDpig optimal für die präklinische Forschung nutzen zu können, ergab sich zudem die Fragestellung nach dem Nachweis des Proteins Utrophin im Zellkulturextrakt. Das Protein Utrophin ist dem Protein Dystrophin sehr ähnlich und ersetzt dieses in der Embryonalphase (Helliwell et al. 1992; Clerk et al. 1993; Guiraud et al. 2017). Utrophin ist bei *mdx*-Mäusen hochreguliert und wahrscheinlich ursächlich für den ihren milden Phänotyp (Tinsley et al. 1998). Daher gibt es in der aktuellen Diskussion um die Entwicklung einer potenziellen Therapie für DMD den Ansatz, Utrophin als Ersatztherapie hochzuregulieren (Walter 2018; Guiraud et al. 2017; Guiraud et al. 2019). Die neu etablierte Nachweismethode zur Messung von Utrophin in porcinen Zelllysaten zeigte, dass die Utrophin-Expression in Myotuben von DMDpigs im Vergleich zu den WT-Geschwistern nicht hochreguliert ist und somit der Situation in DMD-Patienten entspricht (vgl. Abbildung 8 (Donandt et al. 2022)).

4.2 Paper II

Um das Zellkulturmodell des DMDpigs mit humanen und murinen Zellkulturmodellen zu vergleichen, wurde der Differenzierungsprozess aller drei Modelle verglichen und die Expression von verschiedenen Dystrophin-Isoformen von Tag null bis sechs der Differenzierung beobachtet.

Das Protein Dystrophin ist ein Teil des Multiproteinkomplexes DGC und hauptsächlich im Cytoplasma von Herz- und Skelettmuskulatur lokalisiert; dort verbindet es wie ein Gerüst die Innenseite einer Muskelfaser mit dessen Außenseite (Muntoni et al. 2003;

Blake et al. 2002). Die Ergebnisse unserer IFs zeigten jedoch neben der Dystrophin-Lokalisierung im Cytoplasma der Myotuben auch eine Dystrophin-Färbung an der Kernmembran und innerhalb der Zellkerne von Myoblasten und Myotuben verschiedener Spezies. Diese Färbung ist je nach Entwicklungsstand der einzelnen Muskelzelle unterschiedlich lokalisiert. Um auszuschließen, dass es sich um Artefakte handelte, wurde die Färbung mit verschiedenen Beschichtungen (Methanol und Paraformaldehyd (PFA)) und verschiedenen Dystrophin-Antikörpern wiederholt. Diese Färbungen unterschieden sich zwar in Intensität und Qualität, zeigten jedoch alle ein IF-Signal an der Kernmembran und teilweise auch innerhalb der Zellkerne (**Abbildung 6**). Somit konnten methodische Artefakte nahezu ausgeschlossen werden (Donandt et al. 2023).

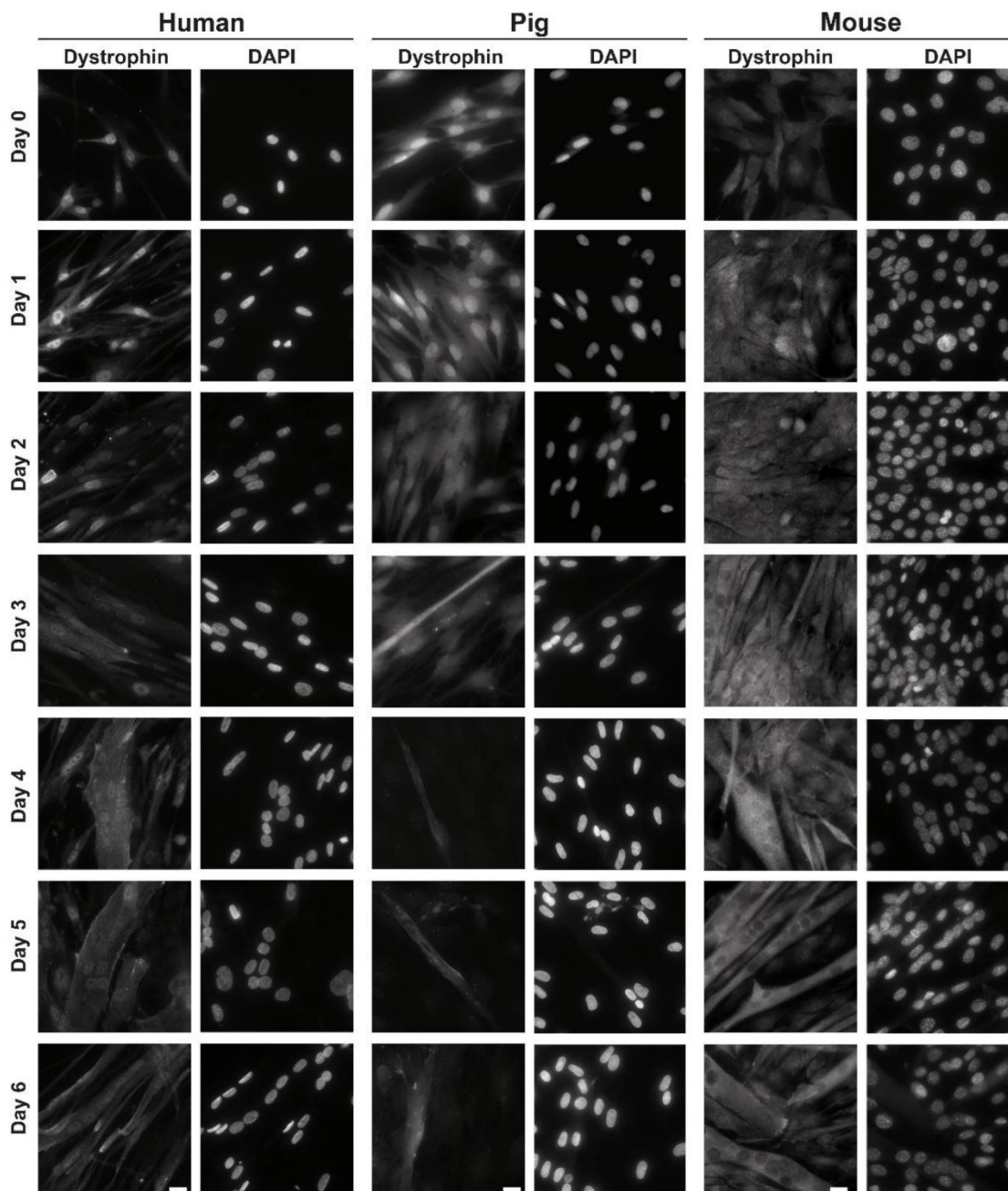


Abbildung 6: Humane (links), porcine (mitte) und murine (rechts) Myoblastenkulturen wurden 6 Tage lang differenziert. An Tag 0 wurde zu Differenzierungsmedium gewechselt und dann wurden alle 24h Objektträger fixiert und mit Dystrophin (links) und DAPI (rechts) gefärbt. Maßstableiste 20 μm . (Donandt et al. 2023).

Diese Ergebnisse wurden mit den Daten aus der RNA-Sequenzierung verglichen, um mögliche Kernmembran-gängige Isoformen von Dystrophin zu bestimmen. Zusätzlich wurde im WB die Dystrophin-Expression während der Differenzierung in den Zellkernen von humanen, porcinen und murinen WT-Zellkulturen im zeitlichen Verlauf zwischen Tag null bis Tag sechs verglichen. Dabei konnten zwei Isoformen (Dp 70 & Dp 40) als potenziell Kernmembran-gängig identifiziert werden (**Abbildung 7**) (Donandt et al. 2023).

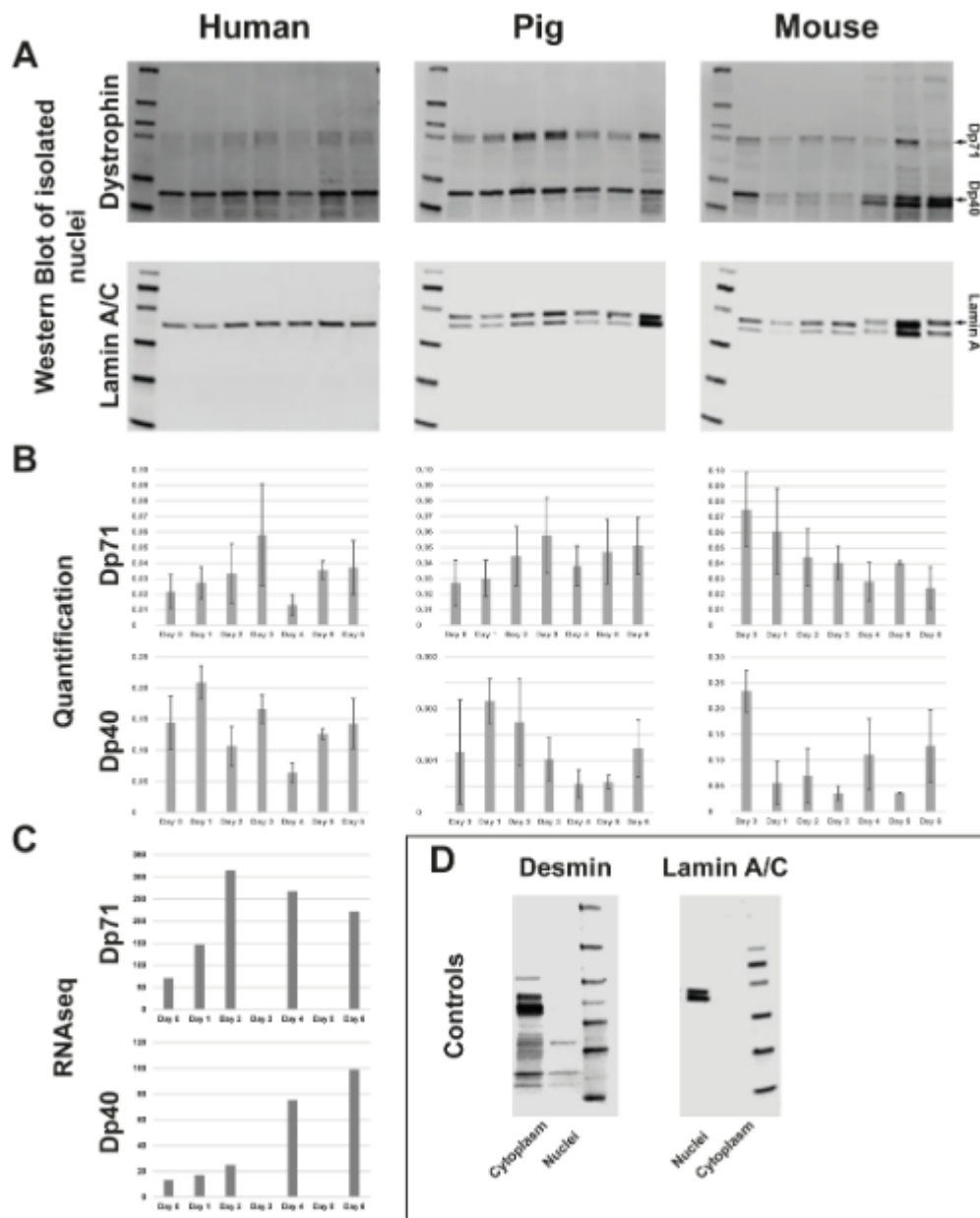


Abbildung 7: Dystrophin-Nachweis im WB von Zellkernen je *in-vitro* Modell (human, porcine, murine) von Tag 0 (links) bis Tag 6 (rechts) der Differenzierung (A & B) im Vergleich zu Daten aus der RNA-Sequenzierung (C). (Donandt et al. 2023).

5. Diskussion und Ausblick

Es gibt aktuell noch keine kausale Therapie für DMD, die nachgewiesenermaßen die Erkrankung heilt. Zwar sind inzwischen eine Vielzahl an verschiedenen Therapieansätzen in verschiedenen Phasen der Zulassungsstudien – eine erste Gentherapie (Elevidys) ist sogar bereits in den USA vorläufig zugelassen (U.S. Food and Drug Administration, 2023) – jedoch kann bisher keine dieser Therapieansätze DMD ursächlich heilen. Es ist daher zu erwarten, dass für diese erbliche Erkrankung in Zukunft wohl nur ein ganzer Cocktail von Substanzen hilfreich sein wird, um eine sichtbare Veränderung des Phänotyps zu erzielen (Walter 2018). Neue Entwicklungen im Bereich der personalisierten Gentherapie sind zwar vielversprechend, aber es wird noch einige Zeit dauern, bis diese Methode Pathologie und Phänotyp der DMD-Patienten tatsächlich verbessern kann (Walter 2018). Erste Ansätze für erfolgreiche Gentherapien wurden bereits in Maus-, Hunde- und Schweinmodellen durchgeführt und lassen auf Fortschritte in der Forschung hoffen (Kupatt et al. 2021).

So vielversprechend Gentherapien für DMD auch klingen mögen, gibt es dennoch noch große Hürden zu meistern. Sowohl bei DMD-Patienten (Mendell et al. 2010) als auch bei Tiermodellen mit Dystrophindefizienz (Gilchrist et al. 2002) gibt es Hinweise darauf, dass die Dystrophin-Wiederherstellung zu einer anti-Dystrophin-Immunantwort führen kann. Ebenso gibt es Immunitäten gegen potenzielle Vektoren, die eine Behandlung verhindern (Verdera et al. 2020). Des Weiteren ist die Größe von Dystrophin ein limitierender Faktor, weil es nur in verkürzter Form, als Mini-Dystrophin, in einen Vektor verpackt werden kann (Kupatt et al. 2021). Zusätzlich stellt sich speziell bei einer systemischen Erkrankung wie DMD die grundsätzliche Frage nach der richtigen Dosis und deren möglicher Toxizität. Ebenso ist unklar, wie viele Zellen „infiziert“ werden müssen, um eine sichtbare klinische Verbesserung zu erreichen. Fragen wie: „Was passiert nach einer erfolgreichen Therapie, wie lange hält das Ergebnis an, muss die Behandlung wiederholt werden und was kommt als Folge des neuen Phänotyps, entstehen ggf. neue Krankheitsbilder?“, müssen in der Folge adressiert werden (Duan et al. 2021).

Eine erfolgreiche Therapie von DMD wird wahrscheinlich zwischen dem zweiten und dritten Lebensjahr beginnen müssen, um den fortschreitenden Verlust von Muskulatur und motorischen Funktionen zu verhindern. Jedoch können klinische Studien mit Endpunkten wie dem „6-Minute-Walk-Test“ oder dem „North Star Ambulatory Assessment“ dann noch nicht durchgeführt werden. Dies ist eine große Schwierigkeit für die Wirksamkeitsprüfung neuer Substanzen (Verhaart et al. 2019; Shieh 2018). Da ein früher Therapiebeginn vor Eintritt der ersten Symptome von DMD wahrscheinlich notwendig sein wird, müsste im Neugeborenen-Screening auf erhöhte CK-Werte untersucht werden, um daraufhin ggf. einen molekulargenetischen Test für DMD durchzuführen (Duan et al. 2021). Alternativ käme auch bei unspezifischer Entwicklungsverzögerung ein CK-

Screening im Rahmen der U7-Untersuchung beim Kinderarzt im Alter von zwei Jahren in Frage (Walter et al. 2019). Dieses Dilemma führt dazu, dass geeignete Tiermodelle entscheidend für den Erfolg der translationalen DMD-Forschung sein werden. Nagetiermodelle sind weit verbreitet, bilden aber die menschliche Krankheit oft nicht genau ab, sodass gute Großtiermodelle für DMD notwendig werden (Wolf et al. 2023).

Fasst man die Vor- und Nachteile der verschiedenen Tiermodelle für DMD zusammen, erscheint das Schwein als Tiermodell hinsichtlich Genetik, Anatomie und Physiologie dem Menschen am nächsten (Klymiuk et al. 2016; Lunney et al. 2021). Schweinmodelle können eine Vorhersage der Effizienz und Sicherheit neuer Therapien oder therapeutischer Geräte am Menschen simulieren (Aigner et al. 2010). Schweine sind wie der Mensch Omnivore, im Gegensatz zu vielen anderen Tieren. Zum Menschen weisen sie zahlreiche Ähnlichkeiten in Anatomie, Physiologie, Pathologie und Stoffwechsel auf. Das Herz-Kreislauf- und Immunsystem sowie die Atem- und Skelettmuskulatur von Schwein und Mensch sind einander sehr ähnlich (Lunney et al. 2021). Zudem sind Schweinmodelle ethisch eher akzeptiert als Hundemodelle, weil das Schwein in unserem Kulturkreis in erster Linie ein landwirtschaftliches Nutztier ist und weniger ein Haustier wie der Hund (Stirm et al. 2022).

Ein gutes Tiermodell wird durch ein valide charakterisiertes und etabliertes Zellkulturmodell komplementiert, um aus Effizienz- und Effektivitätsgründen manche Studien *in-vitro* durchführen zu können und somit Kosten zu sparen. Auch können dadurch groß angelegte Studien zu Toxizität und Wirksamkeit einfacher und schneller durchgeführt werden. Darüber hinaus ist aus ethischem Verantwortungsbewusstsein ein Umgang mit Versuchstieren nach dem 3R-Prinzip („Replace, Reduce, Refine“) notwendig. Das *in-vitro* Modell für das DMDpig in Verbindung mit dem Aufbau der dazugehörigen Muskelbank am FBI ermöglicht die Nutzung des translationalen Tiermodells DMDpig nach diesem Prinzip (Donandt et al. 2022). Ein nächster Schritt für dieses Zellkulturmodell könnte neben der Erforschung von einzelnen Therapieansätzen auch die Immortalisierung von Myoblasten sein, damit einzelne Zelllinien noch länger genutzt werden können.

Ein Handicap des DMDpig-Modells ist, wie bei allen Großtiermodellen in der präklinischen Forschung, die aufwändige und teure Haltung und Reproduktion der Tiere, ebenso wie die lange Reproduktionsdauer und dadurch verursacht geringere Nachkommenzahl im Vergleich zu Nagetiermodellen (Zaynitdinova et al. 2021). Durch dieses Zellkulturmodell können groß angelegte Versuchsreihen bereits vorab *in-vitro* durchgeführt werden, wodurch weniger Versuchstiere benötigt werden und diese Schwäche des Tiermodells überwunden werden kann. Denn genetisch maßgeschneiderte Großtiermodelle können dazu beitragen, die Lücke zwischen Proof-of-Concept-Studien in Nagetiermodellen und klinischen Versuchen an menschlichen Patienten zu schließen (Wolf et al. 2023).

Aufgrund großer Erwartungen an einen kurz bevorstehenden Durchbruch der Gentherapie für DMD werden eventuell andere Therapieoptionen für diese Erkrankung zu wenig

betrachtet. Insbesondere die zunehmende Bedeutung von einzelnen Dystrophin-Isoformen in Bezug auf die unterschiedliche Ausprägung des DMD-Phänotyps und deren Potenzial für mögliche Therapieansätze lassen hier noch Raum für zukünftige Fragestellungen. Die Isoform Dp 140 des Dystrophin-Gens steht in Zusammenhang mit kognitiver Entwicklung (Doorenweerd et al. 2017); bei der Isoform Dp 71, die sowohl im Muskel als auch im Gehirn exprimiert wird, wird ein Zusammenhang mit neuropsychiatrischen Syndromen vermutet (Naidoo et al. 2020). Zudem gibt es einige wenige Publikationen, die die kurzfristige Expression von Dystrophin im Zellkern von Muskelzellen *in-vivo* (Morin et al. 2023) und *in-vitro* (Donandt et al. 2023) beschreiben. Es besteht hier weiterer Forschungsbedarf, um zu klären, warum und wie in einzelnen Zellen – eventuell unter Stress – das cytoplasmatische Protein Dystrophin ein Signal im Myonucleus verschiedener Spezies erzeugt und was das für mögliche Therapieansätze bedeuten könnte.

Abschließend sollte auch auf die sozial-ökonomische Dringlichkeit für die präklinische Forschung an DMD hingewiesen werden. Unter dem Begriff „Cost-of-Illness“ (COI) versteht man die Kosten, welche durch eine Erkrankung verursacht werden. Darunter fallen Kosten für Medikamente, Therapie, medizinische Alltagshilfen, aber auch der Arbeitsausfall der Patienten selbst und seiner pflegenden Angehörigen. Diese COI sind gemäß einer Studie für DMD doppelt so hoch wie für BMD (Schreiber-Katz et al. 2014). Gerade in Bezug auf eine mögliche Therapieentwicklung für DMD und deren Dringlichkeit aus sozial-ökonomischer Sicht sind diese COI ein wichtiges Argument, was bei aller ethischen Problematik nicht außer Acht gelassen werden darf. Denn bereits eine therapeutische Verbesserung von einem DMD-Patienten zu einem BMD-Patienten würde die COI halbieren und erhöht damit neben dem unmittelbaren Patientenleid den dringenden Bedarf zur raschen Entwicklung einer kausalen Therapie für DMD.

6. Zusammenfassung

Die Duchenne Muskeldystrophie (DMD) ist eine letale, progressiv voranschreitende neuromuskuläre Erkrankung. Sie wird X-chromosomal vererbt und durch Mutationen im *DMD*-Gen, einem der größten Gene des menschlichen Erbguts, verursacht. Obwohl inzwischen eine Vielzahl an Therapieansätzen in klinischen Studien untersucht werden und erste Therapieansätze bereits für bestimmte Subgruppen von DMD-Patienten zugelassen sind, gibt es nach wie vor keine kausale Therapie der Erkrankung. Durch eine symptomatische Behandlung konnte die Lebenserwartung der DMD-Patienten zwar in den letzten Jahren verdoppelt werden, aber keiner der kausalen Therapieansätze führt zu einer Heilung der Erkrankung. Aufgrund der häufig späten Diagnosestellung mit Eintreten der ersten Symptome im Kindergartenalter und dem typischen Behandlungsbeginn in einer Hochplateau-Phase der Erkrankung im Vorschulalter der Kinder ist es schwierig, die Ergebnisse von potenziellen Therapien für DMD im frühen Behandlungsstadium zu messen. Daher war die Entwicklung des translationalen Großtiermodells DMDpig von unserer Forschungsgruppe für die präklinische Forschung an DMD von hoher Bedeutung. Das DMDpig zeigt einen nahezu identischen Phänotyp wie DMD-Patienten (u. a. eine degenerative Myopathie, Kardiomyopathie, kognitive Einschränkungen), dabei aber einen akzelerierten Krankheitsverlauf. Erste Therapieansätze wie Exon-Skipping und die Gentherapie CRISP-Cas9 mit AAV-Vektoren konnten bereits an dem Tiermodell *in-vivo* getestet werden. Allerdings ist es aus ethischer und ökonomischer Sicht wesentlich, dass neben einem Tiermodell auch ein valides Zellkulturmodell etablieren wird. Die Entwicklung dieses Zellkulturmodells für das neue translationale Großtiermodell DMDpig war zur Einhaltung des 3R-Prinzips („Replace, Reduce, Refine“) bei Tierversuchen und um die Hindernisse von Großtiermodellen (hohe Kosten, lange Reproduktionszeiten, geringere Nachkommenzahl als bei Nagetieren) zu überwinden von großer Bedeutung. Die erfolgreiche praktische Anwendbarkeit dieses *in-vitro* Modells in der präklinischen Grundlagenforschung konnte anhand der zeitlichen Entwicklung von einzelnen Dystrophin-Isoformen (Dp 71 & Dp 40) während der Differenzierung demonstriert werden. Interessanterweise konnte dabei gezeigt werden, dass myogene DMDpig Zellen *in-vitro* humanen Zellen ähnlicher sind als murine Zellen. Eine bisher wenig erforschte nukleäre Lokalisation des an der extrazellulären Matrix befindlichen Proteins Dystrophin konnte während der *in-vitro* Differenzierung von myogenen Zellen gezeigt werden. Insbesondere in Bezug auf die Beteiligung von bestimmten Dystrophin-Isoformen an der Ausprägung unterschiedlicher Phänotypen bei DMD besteht hier weiterer Forschungsbedarf, um die genauen physiologischen Abläufe am Zellkern durch die unterschiedlichen Proteine besser zu verstehen.

7. Abstract (English)

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a progressive and fatal neuromuscular disease. DMD is X-chromosomal inherited and caused by mutations in the *DMD*-gene, one of the largest genes in the human genome. Although many therapeutic approaches are in clinical trials, and the first therapeutic approaches have already been approved for a subgroup of patients, there is still no cure for this disease. Within the last years, the life expectancy of DMD patients could be duplicated by symptomatic treatment, but even causative therapeutic approaches are mainly disease-modifying. However, measuring the outcomes of potential therapies for DMD in the early stages of therapy is still difficult, due to the frequently delayed diagnosis along with the onset of the first unspecific symptoms in early childhood. Therefore, our research group's development of the translational large animal model DMDpig constitutes a hallmark in conducting preclinical studies to further investigate DMD. The DMDpig nicely mirrors the phenotype of DMD patients (including a degenerative muscle disease, cardiomyopathy, and cognitive impairments), but with an accelerated disease course. Therapeutic approaches such as exon-skipping and CRISP-Cas9 gene therapy via AAV-vectors have already been tested *in-vivo* in this animal model. However, from an ethical and economic point of view, every good animal model needs a valid cell culture model as well. The development of our cell culture model for this new translational large animal model was a milestone in DMD research for respecting the 3Rs („Replace, Reduce, Refine“) in animal experiments, and for overcoming the drawbacks of large animal models (high-cost, long reproductive cycles, lower number of offspring than rodents). The successful application of this *in-vitro* model for preclinical research of DMD was shown by the examination of the development of dystrophin-isoforms (Dp 71 & Dp 40) during the differentiation process of myoblasts into myotubes. Interestingly, myogenic DMDpig cells behave *in-vitro* more similarly to human cells than murine cells. Nuclear localization of the protein dystrophin, normally located in the extracellular matrix, could be shown during the differentiation of myogenic cells. Regarding the involvement of certain isoforms in the expression of different phenotypes in DMD, there is a large unmet need for research to understand the physiological processes of different proteins in the nucleus and how those impact the phenotype of DMD.

8. Paper I



Article

Isolation and Characterization of Primary DMD Pig Muscle Cells as an *In Vitro* Model for Preclinical Research on Duchenne Muscular Dystrophy

Tina Donandt ¹, Stefan Hintze ¹, Sabine Krause ¹, Eckhard Wolf ² , Benedikt Schoser ¹ , Maggie C. Walter ¹ and Peter Meinke ^{1,*}

¹ Friedrich-Baur-Institute at the Department of Neurology, University Hospital, Ludwig-Maximilians-Universität München, 81377 Munich, Germany

² Chair for Molecular Animal Breeding and Biotechnology, Gene Center and Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-Universität München, 81377 Munich, Germany

* Correspondence: peter.meinke@med.uni-muenchen.de; Tel.: +49-(0)-89-2180-78279



Citation: Donandt, T.; Hintze, S.; Krause, S.; Wolf, E.; Schoser, B.; Walter, M.C.; Meinke, P. Isolation and Characterization of Primary DMD Pig Muscle Cells as an *In Vitro* Model for Preclinical Research on Duchenne Muscular Dystrophy. *Life* **2022**, *12*, 1668. <https://doi.org/10.3390/life12101668>

Academic Editors: Gopal J. Babu and Su Hao Lo

Received: 30 August 2022

Accepted: 12 October 2022

Published: 21 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most frequent genetic myopathy in childhood and leads to progressive muscle atrophy, weakness, and premature death. So far, there is no curative treatment available. Therapeutic development from bench to bedside takes time, and promising therapies need to be tested in suitable preclinical animal models prior to clinical trials in DMD patients. Existing mouse and dog models are limited with regard to the comparability of the clinical phenotype and the underlying mutation. Therefore, our group established a tailored large animal model of DMD, the DMD pig, mirroring the human size, anatomy, and physiology. For testing novel approaches, we developed a corresponding *in vitro* model, facilitating preclinical testing for toxicity, dosing, and efficacy, which we describe here. We first extracted primary muscle cells from wild-type and DMD pigs of different age groups and characterized those cells, then improved their differentiation process for identification of dystrophin and utrophin in myotubes. Our porcine *in vitro* model represents an important step for the development of novel therapeutic approaches, which should be validated further to minimize the need for living animals for bioassays, and thereby support the '3R' (replace, reduce, refine) principle, as fewer animals have to be raised and treated for preclinical trials.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy; muscle cell culture; DMD pig; DMD; dystrophin; porcine muscle cells

1. Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most frequent genetic myopathy in childhood and leads to progressive muscle atrophy, weakness, and premature death. DMD is caused by mutations in the *DMD* gene encoding dystrophin, a cytoplasmic protein that enables the strength, stability, and functionality of myofibers. Disease-causing mutations, most frequently deletions, typically result in loss of dystrophin [1]. Patients frequently lose ambulation between age 9 and 12. With the loss of ambulation, cardiac and respiratory involvement occurs. Life expectancy is reduced to 30–40 years, although multidisciplinary symptomatic and surgical treatment has considerably improved survival within the last two decades, mainly by standard of care treatment with corticosteroids and non-invasive ventilation [2].

Until today, there is no cure, although DMD is within the target focus of new gene-based therapies [3]. There are two predominant strategies for future treatment, dystrophin-restoring and dystrophin-independent treatment approaches. So far, there are numerous dystrophin-restoring strategies under investigation [4]: exon skipping via antisense oligonucleotides (AONs) in patients with specific out-of-frame deletions that can be spliced to

a shorter but in-frame mRNA [5]; stop-codon read-through targeting nonsense mutations [6]; gene replacement therapies via AAV vectors [7], and gene editing approaches via CRISPR/Cas9 systems [8,9]; or replacement of dystrophin with a surrogate protein, e.g., utrophin [10]. New generation steroids such as vamorolone, histone deacetylase- and NF kappa B-inhibitors, myosin modulators, and agents along the myostatin inhibiting pathway are promising future agents independent of dystrophin and the underlying mutation [11].

Existing mouse and dog models have been crucial to understand the pathophysiologic background of DMD and to develop treatment strategies, but are limited in mirroring the clinical phenotype and the type of mutation [12]. The DMD pig lacking *DMD* exon 52, which has been developed by our group, displays a progressive and markedly accelerated muscular dystrophy, and a similar phenotype compared to the human disease with proximal muscle weakness, cardiac and respiratory involvement [11].

The development of molecular therapies usually requires the usage of *in vitro* models before they are being tested in animal models. This allows an early assessment and, if necessary, modification of the respective approach, thus reducing the number of animals used. Therefore, the choice of the *in vitro* model to be used is an important one. While muscle cells are the obvious choice for DMD, it becomes more complicated choosing the species the muscle cells are gained from. Muscle cell cultures gained directly from DMD patients appear to be the preferred choice, but there is very limited access to these as diagnosis for DMD today does no longer require a muscle biopsy but is based on genetic diagnosis [13]. Thus, methods like immortalization of human muscle cells [14], CRISPR/Cas9 gene editing to create DMD models, using immortalized cells [15], or reprogramming of different cell types (e.g., urine derived cells, [16]) have been employed [17]. However, benefits of these model systems should be weighed against possible disadvantages, since cellular senescence is a contributing factor in DMD [18], a readout that will be lost in immortalized cells. Another consideration is the animal model used later on—it is preferable testing the respective therapy in a model system derived from the animal model of choice due to possible species-specific characteristics. Here, we describe our experience in extracting, cultivating, and differentiating primary muscle cell cultures from DMD and wild-type pigs as an *in vitro* model for DMD.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

The generation and characterization of the DMD pig have been published elsewhere [12,19]. In short, a German Landrace and Swabian-Hall mix sow with a heterozygous *DMD* exon 52 deletion (*DMD* Δ 52) was interbred with wild-type boars, resulting in the following offspring: male *DMD* Δ 52 pigs (*DMD*^{Y/-} or DMD pig), heterozygous *DMD* Δ 52 carrier pigs (*DMD*^{+/-}), and male and female wild-type pigs (WT). Tissues of male pigs of different age groups (3 days up to 9 months) were used to build up a muscle bank with myoblasts of DMD pigs and their wild-type siblings.

2.2. Isolation of Different Muscle Groups

To adapt for potential differences between muscle groups, we decided to isolate muscle cells from four different muscle groups with different characteristics. These muscles were *Musculus biceps femoris*, *Musculus triceps brachii*, *Musculus semitendinosus*, and *Musculus masseter* (Figure 1).

Muscle biopsies have been taken within three hours after the death of the respective animal. To ensure sterile conditions, the area of extraction was cleaned with water and then disinfected properly with Braunol® (Figure 2). The extraction of the respective muscle was performed using scalpels. Depending on the age and size of the pig or piglet, the whole muscle or only a part of each muscle were extracted. Each biopsy was divided into two samples, one for cryo-conservation and one to generate the cell culture. Ideally, at least 10 g of each muscle were available. The sample used for cryo-conservation was transferred into a sterile 50-mL centrifugation tube. The other biopsy sample intended for cell culture

was also transferred into a 50-mL centrifugation tube completely filled with solution A (30 mM HEPES, 123 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM glucose, 1 nM phenol red, 100 µg/µL penicillin/streptomycin sulfate, 250 ng/mL amphotericin B).

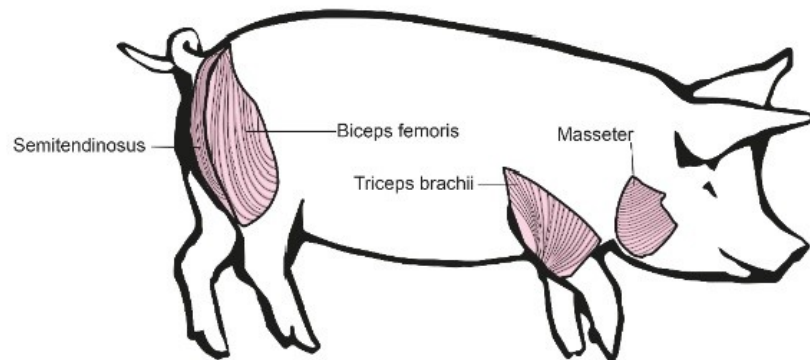


Figure 1. Different muscles used for primary muscle cell culture: *Musculus biceps femoris* and *Musculus semitendinosus* from the pig's hind leg, *Musculus triceps brachii* from the pig's front leg, and *Musculus masseter* from the pig's head.



Figure 2. Taking a muscle biopsy of a DMD pig on the example of the *M. masseter*: (A) set-up of animal and cleaning with water, (B) disinfection of areas of extraction with Braunol[®], (C) skinning of the area, (D) area after extraction (left side), (E) extracted *M. masseter* in a sterile dish.

2.3. Isolation of Satellite Cells

The isolation and enrichment of satellite cells were performed according to the adapted protocols from [20,21]. Briefly, the following steps were performed:

- Using a laminar flow cabinet, solution A was removed from the sample.
- Muscle tissue was separated from connective and fat tissue using a sterile scalpel.
- Then, remaining muscle was weighed, a minimum of 3 g, but if possible, 5–20 g of muscle were used for each primary culture.

- The piece of muscle was cut into very small pieces.
- The cut muscle pieces were magnetically stirred for 20 min at 37 °C in a 500 mL Schott® bottle in 25 mL of Hank's balanced salt solution (HBSS) containing 0.2% collagenase I, 0.01% DNase I, and 0.025% trypsin.
- Following, the bottle was chilled in an ice bath for 2 min.
- The supernatant was transferred into fresh tubes and mixed with an equal amount (1:1) of growth medium (α -MEM, 10% FCS, 1% Glutamax, 0.2% amphotericin B, 0.2% gentamicin). For the remaining muscle piece, the steps from the magnetic stirring to the transfer of the supernatant were repeated two times.
- This mix was filtered through a 100 μ m micro strainer and then centrifuged (800 \times g, 10 min, 4 °C).
- The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 15 mL of growth medium (4 °C).
- The suspension was then filtered through a 70 μ m micro strainer and centrifuged (800 \times g, 10 min, 4 °C).
- The supernatant was discarded and the pellet resuspended in 12 mL of PBS.
- The suspension was slowly and carefully given on top of a step gradient [(50-mL tube containing 3 mL of a 60% Percoll-solution (Easycoll and PBS, lower layer) and 35 mL of a 20% Percoll-solution (upper layer)].
- This 50 mL tube was centrifuged (4800 \times g, 45 min, 4 °C, no brake)
- The boundary layer between the 20% and the 60% Percoll-solution was taken out by a sterile Pasteur pipette (approx. 8–12 mL), transferred into a new sterile tube, and mixed with 15 mL of growth medium. This suspension was centrifuged (500 \times g, 10 min, 4 °C), the supernatant was discarded, and the pellet resuspended in 10 mL growth medium.
- Depending on the size of the pellet, approx. 1 mL cell-pellet was transferred with 18 mL of additional growth medium into one 75 cm² cell culture bottle.
- The newly harvested satellite cells were grown in growth medium in a 37 °C incubator with 5% CO₂ for 24 h. The growth medium was changed after one day.
- A mycoplasma infection test was made regularly with the cells, using the MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (LT07-118, Lonza, Basel, Switzerland).

2.4. Cell Growth, Storage, and Differentiation

Cells were grown at 37 °C and 5% CO₂ until they reached a confluency of 60–70%. Passaging cells were split at the confluency 1:2 using trypsin, and during passaging, coverslips were added at this stage for later fixation if necessary. Storage cells were frozen in freezing medium consisting of 90% FCS and 10% DMSO. Cells were brought slowly to –80 °C using Nalgene® Mr. Frosty™ (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and transferred into liquid nitrogen after 48 h for long-term storage.

For differentiation, dishes were coated using a Matrigel-based coating mixture (0.5% Maxgel ECM solution and 0.04% pig skin gelatine solution in Dulbecco's modified Eagle's medium). Myoblasts were seeded in growth medium on the coated plates. At about 80 to 90% confluence, the growth medium was replaced by the differentiation medium (DMEM high glucose with 0.4% Ultrosor G, 0.22% amphotericin B, and 0.2% gentamicin). Myotubes were differentiated for 4–12 days, depending on the needs of each project. The differentiation medium was exchanged partially every 2 days.

For the coating experiments, the MicroMatrix™ 36 plate from MicroStem was used. According to the manufacturer's protocol, the MicroMatrix™ 36 slide was washed once with 5 mL PBS and once with 5 mL growth medium. Then, 150,000 cells were seeded out in 5 mL of growth medium and incubated at 37 °C with 5% CO₂. After 24 h, the slide (containing 36 different coating areas, each having nine coated spots and including a field as negative control) was imaged. For this experiment, we used myoblasts of a four-month-old DMD pig and its male wild-type sibling at passage 9.

2.5. Western Blot

Western blot was performed using BioRad's Tetra electrophoresis chamber and the TransBlot Turbo[®] system for the actual protein blotting. Whole cell lysates were generated with RIPA buffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl 1% NP40 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, freshly added protease inhibitor tablet from Roche (Complete Ultra protease inhibitors #05 892 970 001)), a MagNA Lyser (Roche) or a Bandelin Sonopuls ultra sonicator. Then, 25 µg whole protein was used per lane in the different blots. For normalization and quantification, we used GAPDH as a loading control (antibodies Cell Signalling D16H11; Millipore MAB374, 1:10,000). The following primary antibodies were used for the utrophin (Santa Cruz 8A4 #SC-33700, 1:500 in 5% BSA/TBST) or dystrophin (ab15266, 1:500 in 1% CWS/TBST) blots. All Western blots were detected in the LiCor Odyssey Fc Imaging System using fluorescent secondary antibodies (Donkey anti-rabbit 800 CW 926-32213, Donkey anti-mouse 680RD 926-68072, Donkey anti-rabbit 680 RD 926-68073, and Donkey anti-mouse 800 CW 926-32212).

2.6. Immunofluorescence Staining

Proliferating cells were fixed on a coverslip at about 70% confluence, differentiating cells at the respective timepoints of interest. The cells were fixed with ice-cold methanol or 4% PFA in PBS for 15 min. Before staining, PFA fixed cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min. As a myogenic marker, cells were stained for desmin (NBP1-45143, 1:50; or NSJ-R31530, 1:50). To check the proliferation status, cells were stained for Ki-67 (SAB5500134, 1:1000). To differentiate between myoblasts and fibroblasts, we also stained against fibronectin (SC-59826, 1:50). For myoblast differentiation, we stained at different timepoints for myosin heavy chain (Novocastra[™], NCL-MHCf, 1:100) and PCMI (Sigma HPA023370, 1:100). Immunofluorescence pictures were taken with an Olympus IX83 microscope and U Plan X Apo 40× or U Plan X Apo 10× objective. The cell counter function of Image J [22] was used to determine the number of cells (DAPI), as well as the number of cells which were positive for desmin and/or Ki-67.

3. Results

3.1. Characterization of Cell Growth and Myogenic Content

One of the main questions was, if there is a difference between the myoblast cultures gained from different muscle types. To investigate this, we monitored the development of the cultures over several passages. We could not see any difference between myoblasts of wild-type pigs and DMD pigs as well as the age of the animals (data not shown). The muscle used as starting material for the myoblast culture had no effect on the development of the culture (Figure 3). Myoblasts of a four-month-old DMD pig and its male wild-type sibling were grown over eight passages. For this, four different muscle types were used from each animal. When the myoblasts reached 60–70% confluence, they were passaged and coverslips were fixed for immunofluorescence staining. Myoblast cultures of all four muscle types grew at the same level and showed no differences in the day-to-day handling. Within all muscle types as well as age groups, the cell size increased in early passages and the speed of growing decreased from passage five onwards (a confluency of 60–70% was reached after 24 h for the first five passages and for passages six–eight, it took 48 to 72 h).

To test the myogenic and proliferative character of the cell cultures, we cultivated eight different cell lines (four different muscle types of each, a DMD pig and a wild-type pig) over eight passages. We observed very similar data for all eight cell lines: the percentage of myoblasts increased from roughly 60% up to over 90% in passage seven. The size of myoblasts increased up to passage four and kept then at a constant range. However, from passage seven onwards, the cells grew slower. The number of proliferating myoblasts increased up to passage seven to over 40% and then dropped slowly (Figure 4). There was no difference between the four different muscle types or DMD pigs and wild-type pigs.

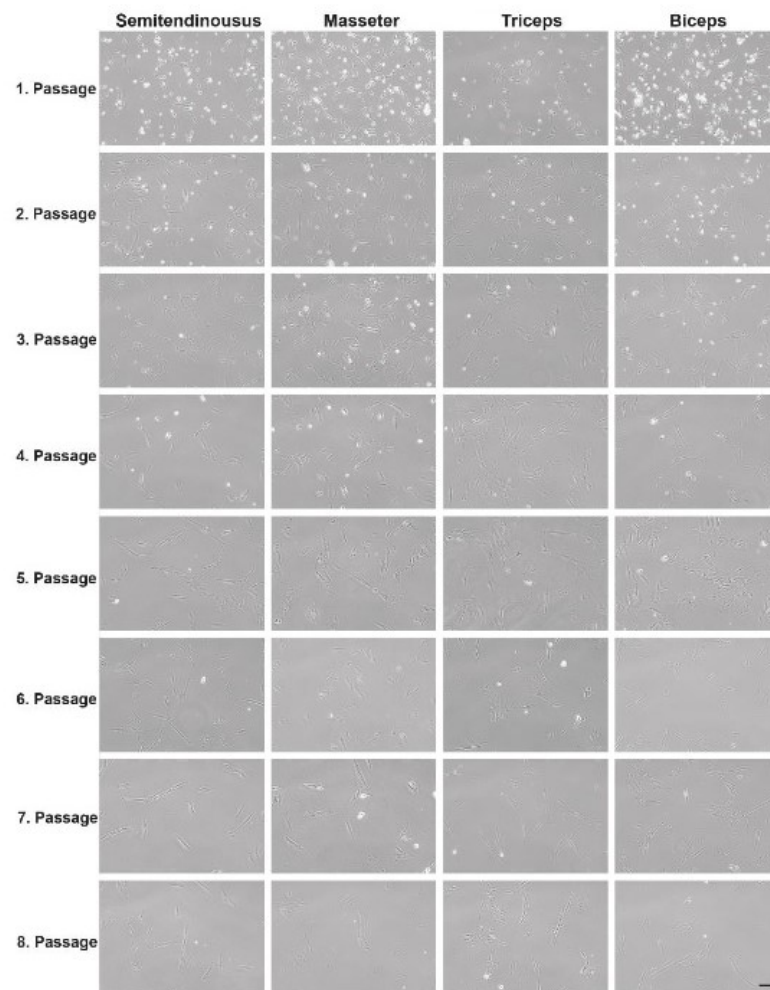


Figure 3. Comparison of cell growth between primary myoblast cultures gained from *Musculus biceps*, *triceps*, *semitendinosus*, and *masseter* of a four-month-old DMD pig. Pictures were taken 24 h after each passaging. Scale bar 100 μ m.

3.2. Differentiation into Myotubes

One of the most important parts of this project was to develop a DMD cell culture model, which gives measurable outputs to detect the success of possible therapy trials *in vitro*. As the full-length isoform of dystrophin is only starting to get expressed during differentiation, it is necessary to develop a reproducible and reliable protocol for the differentiation of porcine myotubes. To determine the level of differentiation, we performed a co-staining with myosin heavy chain and PCMI. PCMI (pericentriolar material 1) is a protein of the centrosome that relocates to the outer nuclear envelope during early muscle differentiation [23]. Myosin heavy chains get expressed during muscle differentiation and associate with the cytoskeleton [24]. This allowed the identification of myotubes as well as the number of nuclei within the myotube. We monitored the differentiation for up to twelve days after the start. Up to six days, we could identify myotubes in both, DMD pig and wild-

type pig cultures. In wild-type cultures, we observed at 6 days, in general, more and bigger myotubes. (Figure 5A), which we confirmed by fusion index (Supplemental Figure S1). After six days of differentiation, the number of myotubes decreased, which was likely due to detachment of mature myotubes.

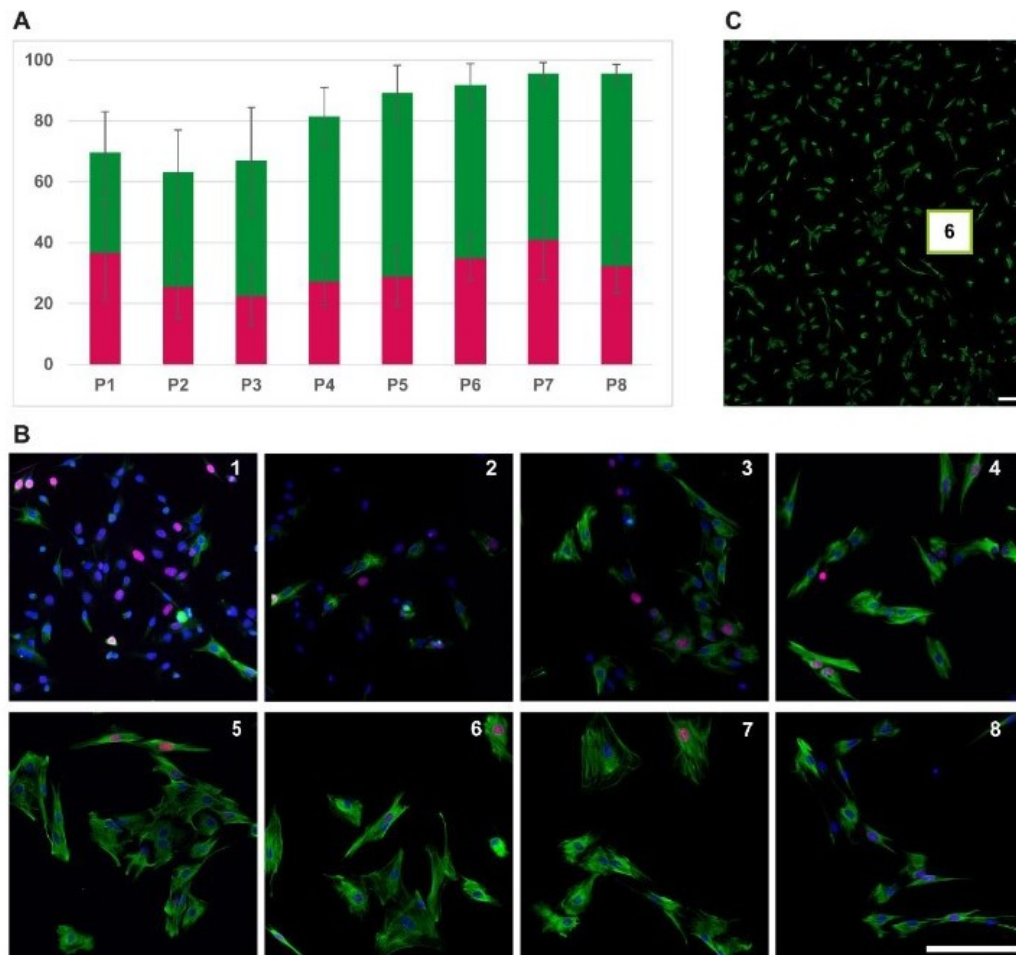


Figure 4. Proliferation over time. (A) Percentage of myoblasts (desmin positive cells) over 8 passages (green) and level of proliferating within the myoblasts (positive for Ki-67, red) with standard deviation, (B) and cell culture of a DMD pig (*M. biceps femoris*) over 8 passages stained for desmin (green) and Ki-67 (red). Coverslips of each passage were fixed 24 h after each passaging. (C) Example for overview pictures (passage 6). Scale bars 200 μ m.

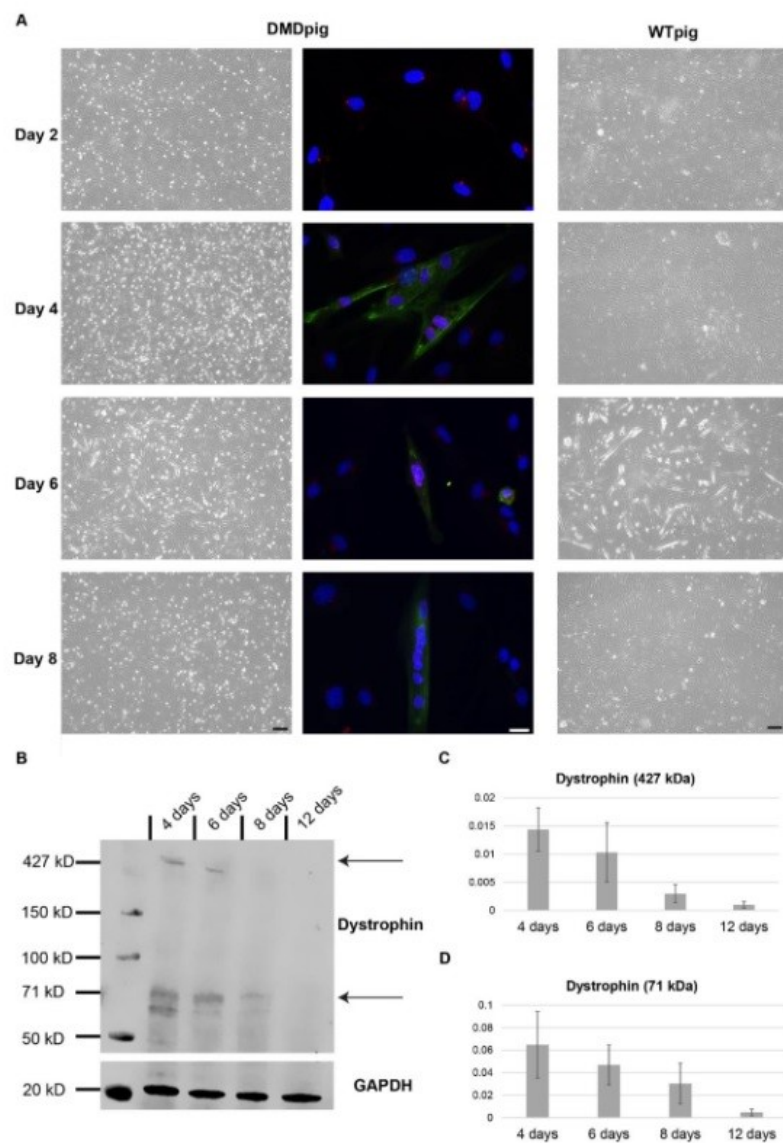


Figure 5. Differentiation of porcine myoblasts and dystrophin expression. The amount of myotubes is the highest between day 3–6 and the dystrophin level decreases with the amount of myotubes from day 6 onwards. (A) Pictures taken at day 2, 4, 6, and 8 of differentiation of DMD pig and wild-type pig cells. At the same time points, an immunofluorescence staining was performed with myosin (green) and PCM 1 (red) antibodies to show the level of differentiation in the DMD pig culture. (B) Western blot showing the expression of dystrophin in wild-type pig cultures. (C) Quantification of full length dystrophin (~427 kDa) and (D) a ~71 kDa isoform. Scale bar 200 μ m and 20 μ m for IF.

The main marker needed in this model is the expression of full-length dystrophin. We performed Western blot on wild-type cultures to identify the level of dystrophin expression during differentiation. We used only wild-type cultures for this as there is no expres-

sion of full-length dystrophin in the DMD pig muscle cultures (Supplemental Figure S2). We identified the strongest expression of full-length dystrophin (~427 kDa) as well as a shorter dystrophin isoform (~71 kDa) after four days of differentiation with a decrease of dystrophin afterwards (Figure 5B–D). This correlated with the presence of myotubes.

We observed differences in differentiation efficiency between the different myoblast cultures, but they were independent of the muscle type used for the biopsy or the age of the animal. The main factor affecting differentiation was the passage number: the lower the passage number, the better the differentiation rate. We got the best differentiation rates during the first four passages. These first passages were also the passages with lower percentage of myoblasts. To investigate if the differentiation efficiency was only due to low passage number or if other factors were involved, we co-stained myoblast cultures for fibronectin and desmin. This showed the presence of fibronectin during early passages, and especially in areas with a strongly positive fibronectin staining, myogenic cells accumulated (Figure 6).

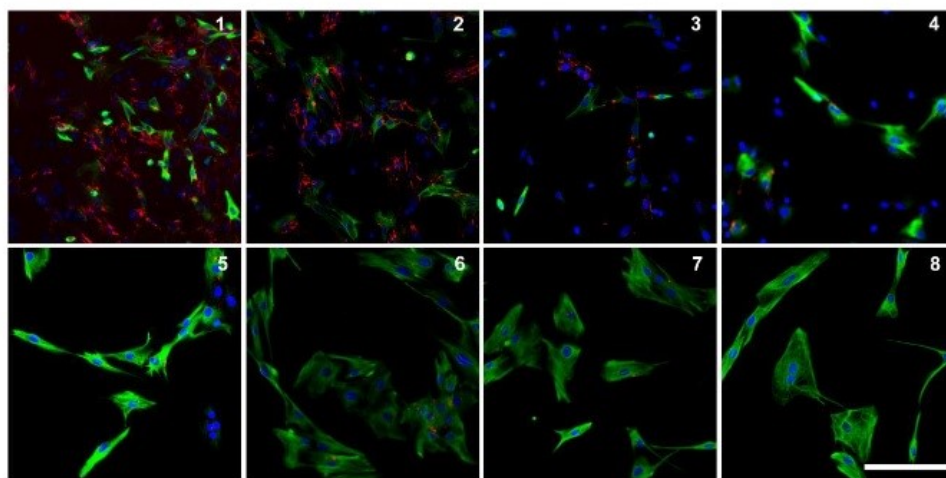


Figure 6. Fibronectin is present in early passages: fibronectin (red) and desmin (green) staining over eight passages of the same cell culture (DMD pig, 4 months old, *M. biceps femoris*). Coverslips have been harvested 24 h after each passaging. Scale bar 200 μ m.

3.3. Coating of Dishes

To verify the effect of coating on the growth of porcine myoblasts, we tested a set of different coating options. This revealed that the biggest number of cells did attach on fibronectin coating, followed by the collagens type I, V, VI and laminin (Figure 7, complete panel tested in Supplemental Figure S3). Cells attached on fibronectin did have a regular shape. After fixation with PFA and staining with DAPI, counting verified that the highest number of cells attached on fibronectin (Supplemental Figure S4).

3.4. Utrophin Expression

Another important readout is the expression of utrophin. Upregulation of utrophin is thought to be compensatory for the loss of dystrophin in DMD mice, thus explaining the relative mild phenotype of these animals [25,26]. We tested myotubes of 3-day and 3-month-old DMD pigs and their male wild-type siblings for utrophin protein expression by Western blot. In myotubes, utrophin levels do not differ significantly from wild type levels (Figure 8).

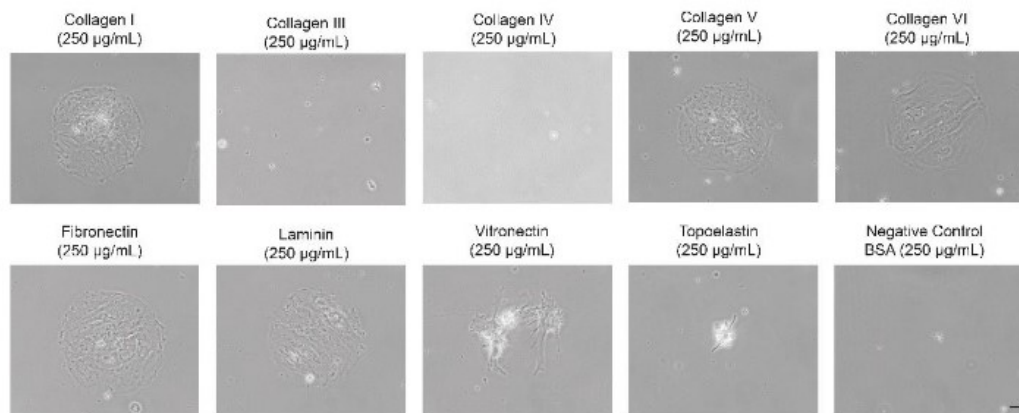


Figure 7. Different coating options confirm fibronectin to be significantly relevant for porcine myoblast proliferation. Nine spots of each coating version were imaged for cell attachment (myoblasts from a four-month-old DMD pig in passage 9 m. biceps femoris) have been imaged 24 h after passaging. Scale bar 20 μ m.

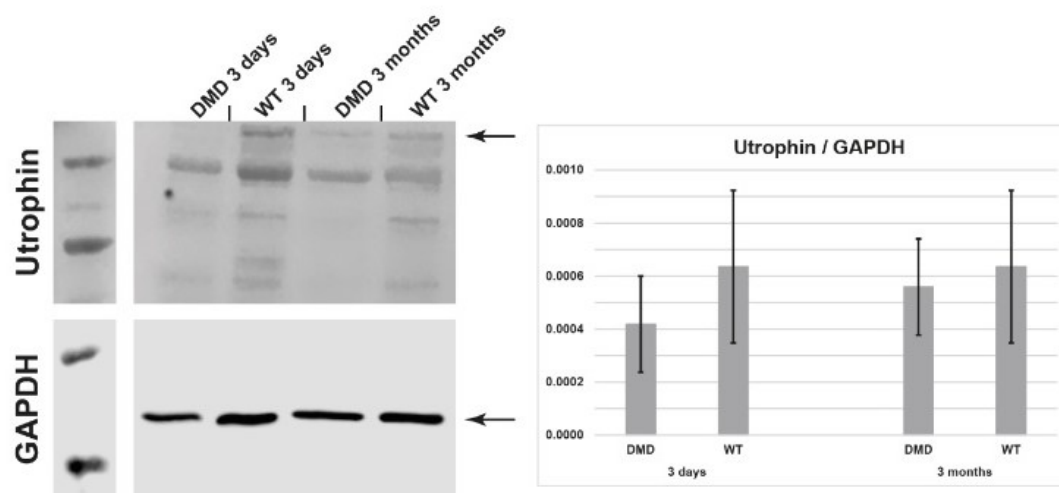


Figure 8. Utrophin expression in myotubes at day 4 of differentiation is not significantly altered in DMD pig myotubes vs. in wild-type myotubes. Myotubes were from a 3-day and a 3-month-old DMD pig (*M. semitendinosus*).

4. Discussion

The DMD pig represents a superior animal model closely mirroring the human phenotype [19]; therefore, we see the utilization of primary DMD pig muscle cells as an *in vitro* model for preclinical research on DMD as an advancement for the scientific community. The DMD pig muscle cells have the potential to provide a starting point for pipeline therapies from *in vitro* testing in cell culture, *in vivo* testing in an animal model, to application in patients [18]. Usage of DMD pig muscle cells for testing therapies has the benefit that the number of animals for experiments can be reduced by screening for the most promising approaches in a way that is directly transferable to the DMD pig, which has been proven to be an extremely relevant model for DMD [19].

For identification of the optimal muscle for *in vitro* cell culture, we tested four different muscle types with different characteristics. The *musculus biceps femoris* is one of the biggest and strongest muscles of a pig. It is located at the hindquarter of the animal directly under the skin, which makes it easy to extract. Due to its heavy usage, it is likely to show signs of muscle weakness early on. The *musculus triceps brachii* is located at the forehead of the pig. Due to its anatomy, the front legs of a pig carry the most weight and therefore, this muscle needs a lot of training and it is under a lot of pressure. That means the severity of illness should be well detectable here. The *musculus semitendinosus* is a separate muscle located at the hindquarter of the pig, it is easy extractable. The *musculus masseter* is—different to other muscles—served by the cranial nerves and has lots of connective tissue. We found no major differences between the muscle cell cultures gained from these four different muscles. This is of potential benefit, as the amount of starting material is therefore not limited by the size of single muscles. This helps especially with very young animals. We used cells from young animals (3 days old), as we expected fast cell growth in tissue culture. These animals also show a similar phenotype to young DMD boys. Furthermore, we used in this study, mainly cells of animals aged 4 months, as they show a very clear phenotype and thus represent a representative timepoint for the muscle phenotype. Pigs at nine months are fully mature, thus completing the spectrum of ages used.

The disease-relevant protein in DMD is full-length dystrophin, which is only starting to be expressed during muscle differentiation. Therefore, we tested the best differentiation conditions. We got two main results from this: (i) we identified fibronectin to be a major factor in differentiation for porcine myoblasts, which confirms recently published data showing that fibronectin enhances marker expression in porcine myoblasts [27]; and (ii) we demonstrated that the maximum differentiation in porcine muscle cell culture is achieved after only 4 days of differentiation. This is in accordance with the observations of other groups [21]. The positive effect of fibronectin on porcine muscle differentiation shows another potential benefit of this tissue culture model: it is beneficial to use co-cultures, therefore a sorting of cell types is not necessary. The relative fast maximum differentiation time of 4 days might reflect the fast muscle growth in pigs but has the potential benefit to allow a faster workflow in tissue culture.

In summary, we found coating with fibronectin (or fibronectin-containing coating) for tissue culture plates and a shortened differentiation time (compared to other species) provide optimal conditions to investigate full-length dystrophin in primary porcine myoblast cultures. Thus, our *in vitro* DMD pig cell culture model has the potential to speed up results from assays that require differentiation, while there is at the same time more starting material available compared to other species like human (only small muscle biopsies, if any are available) or mouse (in general less muscle mass). Thus, the DMD pig muscle cell culture can improve velocity and cost-effectiveness of animal studies.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/life12101668/s1>, Figure S1: fusion index of DMD pig and WT pig muscle cultures at 6 days of differentiation.; Figure S2: expression of full-length dystrophin in WT pig and DMD pig myotubes.; Figure S3: complete panel of coating options tested.; Figure S4: quantification of cells attached to coated spots.; Figure S5: full Western blots.

Author Contributions: Conceptualization, P.M., S.K. and M.C.W.; methodology, T.D. and S.H., writing—original draft preparation, T.D. and P.M.; writing—review and editing, S.K., E.W., B.S. and M.C.W.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: PM is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—Projektnummer 470092532.

Institutional Review Board Statement: All animal experiments were performed according to the German Animal Welfare Act and Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and were approved by the responsible animal welfare authority (Government of Upper Bavaria; permission 55.2-1-54-2532-163-2014.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Birnkrant, D.J.; Bushby, K.; Bann, C.M.; Apkon, S.D.; Blackwell, A.; Brumbaugh, D.; Case, L.E.; Clemens, P.R.; Hadjiyannakis, S.; Pandya, S.; et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: Diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 251–267. [\[CrossRef\]](#)
- Walter, M.C.; Reilich, P. Recent developments in Duchenne muscular dystrophy: Facts and numbers. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2017**, *8*, 681–685. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kupatt, C.; Windisch, A.; Moretti, A.; Wolf, E.; Wurst, W.; Walter, M.C. Genome editing for Duchenne muscular dystrophy: A glimpse of the future? *Gene Ther.* **2021**, *28*, 542–548. [\[CrossRef\]](#)
- Fortunato, F.; Rossi, R.; Falzarano, M.; Ferlini, A. Innovative Therapeutic Approaches for Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 820. [\[CrossRef\]](#)
- Pramono, Z.A.; Takeshima, Y.; Alimsardjono, H.; Ishii, A.; Takeda, S.I.; Matsuo, M. Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *226*, 445–449. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Campbell, C.; Barohn, R.J.; Bertini, E.; Chabrol, B.; Comi, G.P.; Darras, B.T.; Finkel, R.S.; Flanigan, K.M.; Goemans, N.; Iannaccone, S.T.; et al. Meta-analyses of ataluren randomized controlled trials in nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *J. Comp. Eff. Res.* **2020**, *9*, 973–984. [\[CrossRef\]](#)
- Ramos, J.N.; Hollinger, K.; Bengtsson, N.E.; Allen, J.M.; Hauschka, S.D.; Chamberlain, J.S. Development of Novel Microdystrophins with Enhanced Functionality. *Mol. Ther.* **2019**, *27*, 623–635. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Long, C.; Amoasii, L.; Mireault, A.A.; McAnally, J.R.; Li, H.; Sanchez-Ortiz, E.; Bhattacharyya, S.; Shelton, J.M.; Bassel-Duby, R.; Olson, E.N. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science* **2016**, *351*, 400–403. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Amoasii, L.; Long, C.; Li, H.; Mireault, A.A.; Shelton, J.M.; Sanchez-Ortiz, E.; McAnally, J.R.; Bhattacharyya, S.; Schmidt, F.; Grimm, D.; et al. Single-cut genome editing restores dystrophin expression in a new mouse model of muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, eaan8081. [\[CrossRef\]](#)
- Babbs, A.; Chatzopoulou, M.; Edwards, B.; Squire, S.E.; Wilkinson, I.V.; Wynne, G.M.; Russell, A.J.; Davies, K.E. From diagnosis to therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem. Soc. Trans.* **2020**, *48*, 813–821. [\[CrossRef\]](#)
- Stirm, M.; Fonteyne, L.M.; Shashikadze, B.; Stöckl, J.B.; Kurome, M.; Keßler, B.; Zakhartchenko, V.; Kemter, E.; Blum, H.; Arnold, G.J.; et al. Pig models for Duchenne muscular dystrophy—From disease mechanisms to validation of new diagnostic and therapeutic concepts. *Neuromuscul. Disord.* **2022**, *32*, 543–556. [\[CrossRef\]](#)
- Klymiuk, N.; Blutke, A.; Graf, A.; Krause, S.; Burkhardt, K.; Wuensch, A.; Krebs, S.; Kessler, B.; Zakhartchenko, V.; Kurome, M.; et al. Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 4368–4382. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Thomas, S.; Conway, K.M.; Fapo, O.; Street, N.; Mathews, K.D.; Mann, J.R.; Romitti, P.A.; Soim, A.; Westfield, C.; Fox, D.J.; et al. Time to diagnosis of Duchenne muscular dystrophy remains unchanged: Findings from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network, 2000–2015. *Muscle Nerve* **2022**, *66*, 193–197. [\[CrossRef\]](#)
- Nguyen, Q.; Yokota, T. Immortalized Muscle Cell Model to Test the Exon Skipping Efficacy for Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Pers. Med.* **2017**, *7*, 13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Soblechero-Martín, P.; Albiasu-Arteta, E.; Anton-Martinez, A.; de la Puente-Ovejero, L.; García-Jimenez, I.; González-Iglesias, G.; Larrañaga-Aiestaran, I.; López-Martínez, A.; Poyatos-García, J.; Ruiz-Del-Yerro, E.; et al. Duchenne muscular dystrophy cell culture models created by CRISPR/Cas9 gene editing and their application in drug screening. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 18188. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Takizawa, H.; Sato, M.; Aoki, Y. Exon Skipping in Directly Reprogrammed Myotubes Obtained from Human Urine-Derived Cells. *J. Vis. Exp.* **2020**, *7*, e60840. [\[CrossRef\]](#)
- Kodaka, Y.; Rabu, G.; Asakura, A. Skeletal Muscle Cell Induction from Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int.* **2017**, *2017*, 1–16. [\[CrossRef\]](#)
- Sugihara, H.; Teramoto, N.; Nakamura, K.; Shiga, T.; Shirakawa, T.; Matsuo, M.; Ogasawara, M.; Nishino, I.; Matsuwaki, T.; Nishihara, M.; et al. Cellular senescence-mediated exacerbation of Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 16385. [\[CrossRef\]](#)
- Stirm, M.; Fonteyne, L.M.; Shashikadze, B.; Lindner, M.; Chirivi, M.; Lange, A.; Kaufhold, C.; Mayer, C.; Medugorac, I.; Kessler, B.; et al. A scalable, clinically severe pig model for Duchenne muscular dystrophy. *Dis. Model. Mech.* **2021**, *14*, dmm049285. [\[CrossRef\]](#)
- Metzger, K.; Tuchscherer, A.; Palin, M.-F.; Ponsuksili, S.; Kalbe, C. Establishment and validation of cell pools using primary muscle cells derived from satellite cells of pig skeletal muscle. *Vitr. Cell. Dev. Biol.-Anim.* **2019**, *56*, 193–199. [\[CrossRef\]](#)
- Mau, M.; Oksbjerg, N.; Rehfeldt, C. Establishment and conditions for growth and differentiation of a myoblast cell line derived from the semimembranosus muscle of newborn piglets. *Vitr. Cell. Dev. Biol.-Anim.* **2007**, *44*, 504–518. [\[CrossRef\]](#)

22. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Srsen, V.; Fant, X.; Heald, R.; Rabouille, C.; Merdes, A. Centrosome proteins form an insoluble perinuclear matrix during muscle cell differentiation. *BMC Cell Biol.* **2009**, *10*, 28. [[CrossRef](#)]
24. Isaacs, W.B.; Fulton, A.B. Cotranslational assembly of myosin heavy chain in developing cultured skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 6174–6178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tinsley, J.M.; Potter, A.C.; Phelps, S.R.; Fisher, R.; Trickett, J.I.; Davies, K.E. Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* **1996**, *384*, 349–353. [[CrossRef](#)]
26. Zaynitdinova, M.I.; Lavrov, A.V.; Smirnikhina, S.A. Animal models for researching approaches to therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Transgenic Res.* **2021**, *30*, 709–725. [[CrossRef](#)]
27. Siddiqui, S.H.; Subramanian, S.A.; Park, J.; Kang, D.; Khan, M.; Belal, S.A.; Lee, S.C.; Shim, K. Modulatory effects of cell–cell interactions between porcine skeletal muscle satellite cells and fibroblasts on the expression of myogenesis-related genes. *J. Appl. Anim. Res.* **2022**, *50*, 259–268. [[CrossRef](#)]

9. Paper II



Brief Report

Nuclear Small Dystrophin Isoforms during Muscle Differentiation

Tina Donandt, Vanessa Todorow, Stefan Hintze, Alexandra Graupner, Benedikt Schoser , Maggie C. Walter and Peter Meinke *

Friedrich-Baur-Institute at the Department of Neurology, LMU University Hospital, Ludwig Maximilians University, 81377 Munich, Germany; tina.donandt@med.uni-muenchen.de (T.D.); vanessa.todorow@med.uni-muenchen.de (V.T.); stefan.hintze@med.uni-muenchen.de (S.H.); alexandra.graupner@med.uni-muenchen.de (A.G.); benedikt.schoser@med.uni-muenchen.de (B.S.); maggie.walter@med.uni-muenchen.de (M.C.W.)

* Correspondence: peter.meinke@med.uni-muenchen.de; Tel.: +49-(0)-89-2180-78279

Abstract: Mutations in the *DMD* gene can cause Duchenne or Becker muscular dystrophy (DMD/BMD) by affecting the giant isoform of dystrophin, a protein encoded by the *DMD* gene. The role of small dystrophin isoforms is not well investigated yet, and they may play a role in muscle development and molecular pathology. Here, we investigated the nuclear localization of short carboxy-terminal dystrophin isoforms during the in vitro differentiation of human, porcine, and murine myoblast cultures. We could not only confirm the presence of Dp71 in the nucleoplasm and at the nuclear envelope, but we could also identify the Dp40 isoform in muscle nuclei. The localization of both isoforms over the first six days of differentiation was similar between human and porcine myoblasts, but murine myoblasts behaved differently. This highlights the importance of the porcine model in investigating DMD. We could also detect a wave-like pattern of nuclear presence of both Dp71 and Dp40, indicating a direct or indirect involvement in gene expression control during muscle differentiation.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy; muscle cell culture; DMD; dystrophin; porcine muscle cells; nuclear localization



Citation: Donandt, T.; Todorow, V.; Hintze, S.; Graupner, A.; Schoser, B.; Walter, M.C.; Meinke, P. Nuclear Small Dystrophin Isoforms during Muscle Differentiation. *Life* **2023**, *13*, 1367. <https://doi.org/10.3390/life13061367>

Academic Editor: Gopal J. Babu

Received: 4 May 2023

Revised: 5 June 2023

Accepted: 8 June 2023

Published: 11 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The *DMD* gene (ENSG00000198947; Xp21.2-p21.1) gives rise to multiple dystrophin isoforms, which are expressed in a tissue-specific manner. The usage of different promoters, alternative splicing, and alternative poly-A addition sites are factors involved in generating the multiple isoforms described [1–3]. The resulting dystrophin proteins (Dp) have been named according to their molecular mass. So far, the described proteins include Dp427 (full-length dystrophin), Dp260, Dp140, Dp116, Dp71, and Dp40, which are found in different tissues, such as the brain, muscle, retina, kidney, peripheral nerves, liver and lung [1,4].

Dp427 is crucial for the strength and stability of muscle fibers, and its absence results in fiber degeneration [5]. The loss of full-length dystrophin results in Duchenne muscular dystrophy (DMD) [6], while a partial loss, leading to a shortened protein with a reduced function, results in clinically milder Becker muscular dystrophy (BMD) [7]. The role of other dystrophin isoforms in DMD/BMD is implicated but not yet completely solved [8–12].

The carboxy-terminal isoform Dp71, which is expressed ubiquitously, has been linked to myoblast proliferation [13] and neural stem/progenitor cell proliferation and differentiation [14]. This isoform has been shown to localize within and closely around the nucleus of PC12, HeLa, C2C12 and HEK293 cells and human myoblasts [13,15–19], but also to mitochondria [20]. Depletion of Dp71 alters the distribution of aquaporin-4 channels in brain macroglial cells, but the question of which function Dp71 fulfils in the nucleus and how stable it appears there remains unclear.

Another short dystrophin isoform, Dp40, is expressed from the same promoter as Dp71. Dp40 localizes partially to the nucleus in PC12 cells [21,22], appears to be essential for PC12 neuronal differentiation [23] and has a crucial role in presynaptic function [24].

Here, we studied in vitro the localization and expression of carboxy-terminal dystrophin isoforms in differentiating myotubes over the first six days of differentiation in human, porcine and murine myoblast cultures.

2. Materials and Methods

2.1. Tissue Culture

Primary human myoblasts were obtained from the Muscle Tissue Culture Collection (MTCC) at the Friedrich-Baur-Institute (Department of Neurology, LMU Klinikum, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany). The human myoblast culture was obtained with written informed consent of the donor. Ethical approval for this study was obtained from the ethical review committee at the Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany (reference 45-14). Primary porcine myoblasts were obtained as described elsewhere [25]. Mouse myoblasts were kindly provided by Nina Raben.

Human myoblasts were cultured in Skeletal Muscle Growth Medium (PELOBiotech, Munich, Germany) supplemented with GlutaMax, 40 U/mL Penicillin, 0.04 mg/mL Streptomycin, and SkMC supplement. The medium was changed to DMEM containing 5% horse serum for differentiation. Cells were kept in an incubator at 37 °C and 5% CO₂.

Porcine myoblasts were grown in α -MEM supplemented with 10% FCS, 1% Glutamax, 40 U/mL Penicillin, and 0.04 mg/mL Streptomycin on plates coated with Fibronectin (Sigma Aldrich #F0895). For differentiation, the medium was switched to DMEM high glucose with 0.4% Ultrosor G. Cells were kept in an incubator at 37 °C and 5% CO₂.

Mouse myoblasts were cultured in high-glucose DMEM supplemented with 10% FCS, 40 U/mL penicillin, and 0.04 mg/mL Streptomycin at 33 °C with 5% CO₂. To start differentiation, the medium was switched to high-glucose DMEM supplemented with 5% horse serum, 40 U/mL penicillin, and 0.04 mg/mL Streptomycin. Cells were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for differentiation.

During the last passaging before differentiation, several coverslips were placed in the culture dishes. Myoblasts were grown until they were close to reaching confluence. Differentiation medium was exchanged every two days, and cells were differentiated over six days.

2.2. Immunofluorescence Staining

From the starting point of differentiation (day 0) until the last day (day 6), coverslips were fixed with ice-cold methanol on each day. Cells were stained for dystrophin (abcam ab 15277, 1:50) and DAPI. The secondary antibody used was Alexa Four Plus 488 (Invitrogen, Waltham, MA, USA: A32790, anti-rabbit, 1:500). Immunofluorescence pictures were taken with an Olympus IX83 microscope and U Plan X Apo 40x objective. All experiments were repeated at least three times.

2.3. Western Blot

Cell pellets of every differentiation day were resuspended in 1 mL of hypotonic lysis buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM DTT) and could swell for 10–15 min on ice. Nuclei were released by Dounce homogenization of 20 vigorous strokes using a type B pestle (Wheaton, clearance between 0.1 and 0.15 mm). Thereafter, 100 μ L of 1 M KCl were added. Nuclei were then pelleted at 2000 \times g in a swinging bucket rotor for 20 min at 4 °C. The supernatant was transferred into a new 1.5 mL Eppendorf tube, and the pellet was resuspended in 1 mL PBS and pelleted again at 2000 \times g in a swinging bucket rotor for 20 min at 4 °C. The second supernatant was discarded. The nuclei pellets were dissolved in 80 μ L RIPA buffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl 1% NP40 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, freshly added protease inhibitor tablet from Roche (Complete

Ultra protease inhibitors #05 892 970 001)) and then ultrasonicated with a Bandelin Sonopuls ultrasonicator (two times 15 s, $5 \times 10\%$).

Western blot was performed using BioRad's Tetra electrophoresis chamber and the TransBlot Turbo[®] system for protein blotting (BioRad, Hercules, CA, USA). A total of 20 μ g whole protein was used per lane in the different blots. An antibody against lamin A/C (4C10, provided by Glenn E. Morris, 1:500) was used to control the presence of nuclei. Dystrophin (Abcam, Cambridge, UK, ab15266, 1:500 or 1:1000 in 3% BSA/TBST) was used as primary antibody. Desmin (Novus Biological, Littleton, CO, USA, NBP1-45143, 1:1000) was used to control the separation of nuclei. A control for the consistent protein loading of all lanes Total Protein Stain (LiCor, Lincoln, NE, USA) was used. All Western blots were detected in the LiCor Odyssey Fc Imaging System using fluorescent secondary antibodies (Donkey anti-rabbit 800 CW 926-32213, Donkey anti-mouse 680RD 926-68072). All experiments were repeated at least three times.

2.4. RNA-Sequencing

Human myoblasts were harvested at 50% confluence. During the differentiation, cells were harvested at day 0 (90% confluence) and then at days 1, 2, 4, and 6. After two washing steps with $1 \times$ PBS, Trizol[®] was added to the samples. The Trizol[®]/sample mixture was used directly to isolate the RNA using the Dircet-zol[™] RNA MiniPrep PlusKit (ZYMO Research, Freiburg, Germany). Library preparation was performed using the TruSeq Stranded mRNA Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) with the TruSeq RNA Single Index Set A (Illumina) according to the recommended procedure. The quality and size distribution of the generated libraries has been validated using an Agilent 2100 bioanalyzer with a high-sensitivity DNA chip (Agilent, Santa Clara, CA, USA). DNA yield was measured using the Qubit dsDNA HS Assay Kit, followed by pooling of the libraries in batches of 12 and sequencing of 1.2 pM pooled library on an Nextseq 500/High Output Flow Cell Cartridge using a paired-end, 2×76 reads, single-index protocol. Experiments were performed in triplicates.

A sufficient quality of the RNAseq data from was confirmed using FASTQC. Raw reads were mapped to the human GRCh38 genome using STAR v2.7 and sorted with the in-built SortedByCoordinate function, while index files were generated with samtools. The resulting BAM and index files were loaded into the Integrative Genomics Viewer (IGV) web application. Reads mapping to specific exons were counted and normalized against the total number of reads per sample.

2.5. Statistical Analysis

Differences between the different timepoints of differentiation (per dystrophin isoform and per species) were calculated by a non-parametric test (Kruskal-Wallis-Test). The corresponding *p*-values as well as a statistical comparison of any pair of groups are included in Supplementary Figure S3.

3. Results

3.1. Localization of C-Terminal Dys during Muscle Differentiation

We stained dystrophin in human, porcine, and murine differentiating myoblast cultures from day 0 to 6 of differentiation to study the development of dystrophin isoform localization during differentiation. In all species and during all time points, we could detect immunofluorescent staining of dystrophin (Figure 1).

In human myoblasts, there was dystrophin staining within the nucleus and in the cytoplasm at all observer time points. There were, however, differences in the intensity of the staining at the respective cellular location. In proliferating myoblasts (day 0) and until day 2 of differentiation, the nucleoplasmic dystrophin staining was more intense than the cytoplasmic one. At all days, there was also the appearance of nuclear envelope staining in some nuclei (Supplementary Figure S1). From day 3 on, cytoplasmic staining became more intense, especially in forming myotubes (Figure 1, left panel).

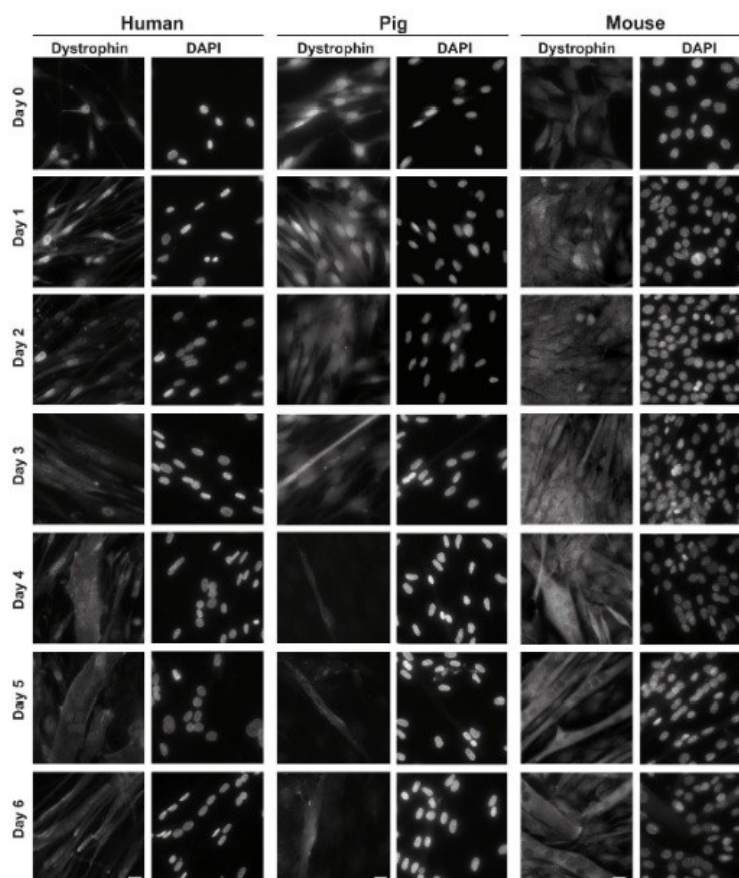


Figure 1. Human (left), porcine (middle) and murine (right) myoblast cultures were differentiated over 6 days. While changing to differentiating medium at day 0 and then every 24 h, coverslips were harvested, fixed and stained with dystrophin (left side) and DAPI (right side). Scale bar, 20 μ m.

In porcine myoblast cultures, there was—similar to human myoblasts—more intensive nucleoplasmic staining from day 0 to day 2 of differentiation. We could also observe a clear nuclear rim staining at these time points. From day 3 to day 6, there was dystrophin staining in the cytoplasm and nucleoplasm of myotubes. In single-nucleated cells, dots within the nuclei were stained (Figure 1, middle panel).

In murine myoblast cultures, we also observed dystrophin staining at all days of differentiation. From day 0 to day 2, there was roughly equal cytoplasmic and nucleoplasmic staining, but from day 3 on, in myotubes, we observed only cytoplasmic staining. At the same time, there was no signal within the nuclei (Figure 1, right panel).

Experiments were repeated at least three times, and occasional nuclear-envelope staining was observed in human as well as porcine cultures up to day 5 of differentiation (in myotubes) and in murine myoblast cultures up to day 2 of differentiation (single nucleated cells; Supplementary Figure S1).

3.2. Quantification of C-Terminal Dystrophin during Muscle Differentiation and RNAseq of Human Myoblast Differentiation

To identify the nuclear dystrophin isoform/isoforms, we isolated nuclei of human, porcine, and murine differentiating myoblast cultures from day 0 to day 6 of differentiation. Separated nuclei were probed via Western blot for the presence of dystrophin isoforms during differentiation.

In human myoblasts, we identified a dystrophin signal probably originating from two bands slightly bigger than 70 kDa at all days of differentiation. The size of these bands fits with Dp71, for which several variants (DP71a, Dp71b, and DP71ab) have been described. There was also a strong signal at about 32 kDa (running below 40 kDa, as also shown elsewhere [21]) and a ladder of weaker smaller bands at all days (Figure 2A, left panel). We also obtained a clear signal for lamin A at all timepoints, which was used to normalize the dystrophin isoforms. Quantification of the DP71 and DP40 bands showed a wave-like picture for DP71, with a constantly increasing signal between day 0 and day 3, a drop on day 4, and an increase until day 6. The DP40 signal also provided a wave-like picture, with an increase from day 0 to day 1, a constant drop until day 4, and an increase from thereon until day 6. Only the day 3 signal deviated by being higher than the trend (Figure 2B, left panel).

As the actual size of the band we identified as Dp40 differs from the expected size (~32 kDa instead of 40 kDa), we utilized RNA-sequencing data of human myoblast differentiation (days 0, 1, 2, 4, 6) to investigate the expression of the exons contributing to the respective isoforms. Dp40 shares all exons with Dp427, and Dp71 and Dp71 share all except one exon with Dp427. This results in the following difference: amino acids KVPYYIN (aa 3069 to 3075 in Dp427) are exchanged to MREQLKG (aa 1 to 7 in Dp71). First, we used this difference to determine the difference between Dp71 and Dp472 expression. As the exons giving rise to Dp40 are shared with Dp71, we then subtracted the average number of reads for Dp472 and Dp71 from the reads in the exons encoding all three isoforms, thus obtaining the average reads for Dp40. This analysis did show a peak of Dp71 expression at day 2, while Dp40 expression constantly increased until day 6 (Figure 2C).

In porcine myoblast cultures, there were also dystrophin signals of the same size as Dp71 and Dp40; overall, the picture was similar to human myoblasts. The lamin A/C antibody stained both lamin A and lamin C (Figure 2A, middle panel). We used lamin A for normalization, and the quantification did show—similar to human myoblasts—a peak of Dp71 in the nucleus at 3 days of differentiation, followed by a drop and increase of the signal until day 6. Dp40 did, also similar to human myoblasts, show a peak of nuclear localization at day 2 followed by a drop until day 4 and an increase from day 4 to day 6 (Figure 2B, middle panel).

In murine myoblasts, all the dystrophin bands observed in human and porcine myoblasts were present as well. The only difference was a more intense band below the Dp40 band from day 4 (Figure 2A, right panel). Quantification of nuclear dystrophin did, however, reveal a different picture than that observed in human and porcine myoblasts. The nuclear localization of Dp71 was strongest in proliferating myoblasts and dropped off constantly during differentiation. Dp40 also had the strongest nuclear localization in proliferating cells, with lower but varying amounts in the following days (Figure 2B, right panel).

To ensure that the separation of the nuclei worked without contamination of the respective other fraction, the nuclear and cytoplasmic fractions were both tested for lamin A/C as a nuclear marker and desmin as a cytoplasmic marker by Western blot. This showed that lamin A/C was only present in the nuclear fraction and desmin (~53 kDa) only in the cytoplasmic fraction (examples shown in Figure 2D).

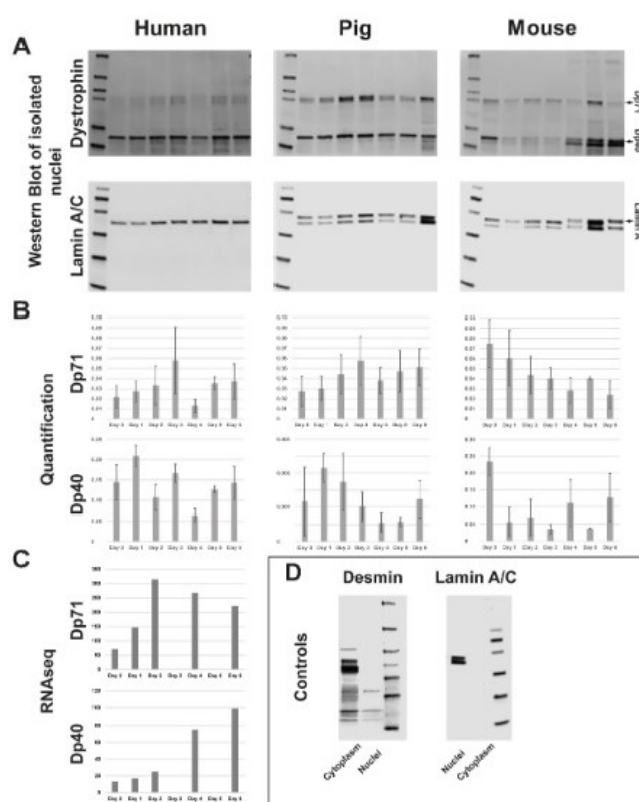


Figure 2. (A) Western blot of separated nuclei from human (left), porcine (middle) and murine (right) myotubes during differentiation from days 0–6. Progression of dystrophin signal in Dp 71 and Dp 40 from day 0 (left side) to day 6 (right side). Each Western blot used the nuclear-envelope protein lamin A as a loading control. (B) Dystrophin signal (Dp 71 and Dp 40) from each species from days 0–6 of differentiation was quantified. (C) RNAseq of human myoblasts during differentiation from days 0–6. (D) Samples were tested for the successful separation of nuclei from cytoplasm with cytoplasmic protein desmin and nuclear-envelope protein lamin A/C (example shown: murine myoblasts). Full pictures of all Western blots are presented in Supplementary Figure S2.

4. Discussion

Mutations in the *DMD* gene are causing DMD, BMD, and dilated cardiomyopathy [26,27]. They can be located all over the *DMD* gene [28], thus potentially affecting different dystrophin isoforms [1]. While the role of full-length dystrophin in the disease pathology is well investigated, the contribution of small isoforms still needs to be solved. The isoform Dp71 is mainly found in brain tissue, but also in myogenic cells and skeletal muscle [8]. Recent findings indicate an important role of Dp71 in neuronal tissue [29]. This makes it a main interest in DMD research, as this is related to a non-progressive cognitive impairment in DMD [30] without always being combined with muscle weakness [31,32]. Despite this, the function of short dystrophin isoforms in muscle is still not completely solved, and its potential influence on the muscle phenotype of DMD/BMD is unknown.

After noticing varying occurrences of nuclear dystrophin staining using an antibody against the c-terminus of dystrophin, we systematically investigated the presence and localization of nuclear short dystrophin isoforms during early differentiation. We could identify a nuclear localization of Dp71 and Dp40 throughout the first six days of in vitro

muscle differentiation. Dp71 and Dp40 do not have a nuclear localization signal. Instead, phosphorylation is thought to be the regulator of nuclear import [29]. It has been shown before that Dp71 enhances the proliferation of myoblasts [13] and can localize to the nucleus and to the nuclear envelope, where it stabilizes nuclear dystrophin-associated proteins [15,17]. We could confirm the nuclear and nuclear-envelope localization of Dp71. However, the increasing nuclear presence until day three of differentiation (and after that again an increased nuclear presence from day four until day six) in human and porcine myoblasts indicates a function different to proliferation enhancement, as the myoblasts are not proliferative anymore from day one of differentiation. The lack of lamin C in human myoblasts may be due to epitope masking, as has been shown for the nuclear envelope proteins lamin B1 and emerin before [33].

The nuclear localization of Dp40 has been shown in PC12 cells [22], and here we can additionally prove it for muscle cells. As the actual Western blot band was running lower than 40 kDa, we confirmed the expression of Dp40 using RNAseq data. During muscle differentiation, the nuclear presence of both human and porcine Dp71 and Dp40 appears to be in waves and is shifted against one other. This may indicate a distinct function in gene expression control, which is undergoing major alterations during muscle differentiation. Expression waves have been described for myogenesis [34], although not in the context of dystrophin.

Another critical question is which model system should be used to investigate the role of short dystrophin isoforms in muscle differentiation and disease. For DMD, the DMD pig is a superior animal model closely mirroring the human phenotype [35], and there is a cell culture system available [25]. The results presented here highlight the importance of the porcine model system. The porcine myoblasts show a nuclear localization of short dystrophin isoforms very similar to human myoblasts during early differentiation. Murine myoblasts did deviate regarding this nuclear localization, but it must be noted that the *mdx* mouse also displays a very mild phenotype compared to humans or pigs [36,37].

In summary, we can extend the knowledge about short dystrophin isoforms during muscle differentiation. Furthermore, it will be helpful to advance research on the function of Dp71 and Dp40 during differentiation to understand the molecular function and the relevance of human disease.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/life13061367/s1>, Figure S1: Examples of nuclear envelope dystrophin staining; Figure S2: All Western blots used for quantification; Figure S3: Statistical analysis of the nuclear presence of both Dp71 and Dp40 for the seven timepoints analyzed per species.

Author Contributions: Conceptualization, P.M., B.S. and M.C.W.; methodology, T.D., V.T., A.G. and S.H., writing—original draft preparation, T.D. and P.M.; writing—review and editing, S.H., V.T., B.S. and M.C.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: PM is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—Projektnummer 470092532.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Ethical approval for this study was obtained from the ethical review committee at the Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany (reference 45-14).

Informed Consent Statement: Primary human myoblasts were obtained from the Muscle Tissue Culture Collection (MTCC) at the Friedrich-Baur-Institute (Department of Neurology, LMU Klinikum, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany). The human myoblast culture was obtained with written informed consent of the donor.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in this article (and supplementary material).

Acknowledgments: The Muscular Dystrophy Association (USA) supports monoclonal antibody development in the laboratory of Glenn E. Morris, who we want to thank for providing lamin A/C and antibodies.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the study's design; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Muntoni, F.; Torelli, S.; Ferlini, A. Dystrophin and mutations: One gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* **2003**, *2*, 731–740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tinsley, J.M.; Blake, D.J.; Davies, K.E. Davies, Apo-dystrophin-3: A 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Hum. Mol. Genet.* **1993**, *2*, 521–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Feener, C.A.; Koenig, M.; Kunkel, L.M. Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* **1989**, *338*, 509–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- García-Cruz, C.J.; Lourdel, S.; Annan, A.; Roger, J.E.; Montanez, C.; Vaillend, C. Tissue- and cell-specific whole-transcriptome meta-analysis from brain and retina reveals differential expression of dystrophin complexes and new dystrophin spliced isoforms. *Hum. Mol. Genet.* **2023**, *32*, 659–676. [[CrossRef](#)]
- Deconinck, N.; Dan, B. Pathophysiology of Duchenne muscular dystrophy: Current hypotheses. *Pediatr. Neurol.* **2007**, *36*, 1–7. [[CrossRef](#)]
- Hoffman, E.P.; Brown, R.H., Jr.; Kunkel, L.M. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **1987**, *51*, 919–928. [[CrossRef](#)]
- Koenig, M.; Beggs, A.H.; Moyer, M.; Scherpf, S.; Heindrich, K.; Bettecken, T.; Meng, G.; Müller, C.R.; Lindlöf, M.; Kaariainen, H.; et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* **1989**, *45*, 498–506.
- Cheshytre, M.; Ridout, D.; Hashimoto, Y.; Ookubo, Y.; Torelli, S.; Maresh, K.; Ricotti, V.; Abbott, L.; Gupta, V.A.; Main, M.; et al. Investigating the role of dystrophin isoform deficiency in motor function in Duchenne muscular dystrophy. *J. Cachex- Sarcopenia Muscle* **2022**, *13*, 1360–1372. [[CrossRef](#)]
- Iskandar, K.; Triono, A.; Sunartini; Dwianingsih, E.K.; Indraswari, B.W.; Kirana, I.R.; Ivana, G.; Sutomo, R.; Patria, S.Y.; Herini, E.S.; et al. Dp71 and intellectual disability in Indonesian patients with Duchenne muscular dystrophy. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0276640. [[CrossRef](#)]
- Lim, K.R.Q.; Shah, N.A.; Woo, S.; Wilton-Clark, H.; Zhabyeyev, P.; Wang, F.; Maruyama, R.; Oudit, G.Y.; Yokota, T. Natural History of a Mouse Model Overexpressing the Dp71 Dystrophin Isoform. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12617. [[CrossRef](#)]
- Schorling, D.; Müller, C.; Pechmann, A.; Borell, S.; Rosenfelder, S.; Kölbl, H.; Schara, U.; Zieger, B.; Kirschner, J. Impaired secretion of platelet granules in patients with Duchenne muscular dystrophy—Results of a prospective diagnostic study. *Neuromuscul. Disord.* **2020**, *31*, 35–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Matsumoto, M.; Awano, H.; Lee, T.; Takeshima, Y.; Matsuo, M.; Iijima, K. 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.* **2017**, *27*, 1023–1028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Farea, M.; Maeta, K.; Nishio, H.; Matsuo, M. Human Dystrophin Dp71ab Enhances the Proliferation of Myoblasts Across Species But Not Human Nonmyoblast Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 877612. [[CrossRef](#)]
- Paúl-González, S.; Aragón, J.; Rodríguez-Martínez, G.; Romo-Yáñez, J.; Montanez, C. Differential expression of Dp71 and Dp40 isoforms in proliferating and differentiated neural stem cells: Identification of Dp40 splicing variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *560*, 152–158. [[CrossRef](#)]
- Villarreal-Silva, M.; Suárez-Sánchez, R.; Rodríguez-Muñoz, R.; Mornet, D.; Cisneros, B. Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells. *Neurochem. Res.* **2010**, *35*, 366–373. [[CrossRef](#)]
- Fuentes-Mera, L.; Rodríguez-Muñoz, R.; González-Ramírez, R.; García-Sierra, F.; González, E.; Mornet, D.; Cisneros, B. Characterization of a novel Dp71 dystrophin-associated protein complex (DAPC) present in the nucleus of HeLa cells: Members of the nuclear DAPC associate with the nuclear matrix. *Exp. Cell Res.* **2006**, *312*, 3023–3035. [[CrossRef](#)]
- González-Ramírez, R.; Morales-Lázaro, S.; Tapia-Ramírez, V.; Mornet, D.; Cisneros, B. Nuclear and nuclear envelope localization of dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cells: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *105*, 735–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Suarez-Sanchez, R.; Aguilar, A.; Wagstaff, K.M.; Velez, G.; Azuara-Medina, P.M.; Gomez, P.; Vasquez-Limeta, A.; Hernandez-Hernandez, O.; Lieu, K.G.; Jans, D.A.; et al. Nucleocytoplasmic shuttling of the Duchenne muscular dystrophy gene product dystrophin Dp71d is dependent on the importin alpha/beta and CRM1 nuclear transporters and microtubule motor dynein. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 985–1001. [[CrossRef](#)]
- Nishida, A.; Yasuno, S.; Takeuchi, A.; Awano, H.; Lee, T.; Niba, E.T.E.; Fujimoto, T.; Itoh, K.; Takeshima, Y.; Nishio, H.; et al. HEK293 cells express dystrophin Dp71 with nucleus-specific localization of Dp71ab. *Histochem. Cell. Biol.* **2016**, *146*, 301–309. [[CrossRef](#)]
- Niba, E.T.E.; Awano, H.; Lee, T.; Takeshima, Y.; Shinohara, M.; Nishio, H.; Matsuo, M. Dystrophin Dp71 Subisoforms Localize to the Mitochondria of Human Cells. *Life* **2021**, *11*, 978. [[CrossRef](#)]

21. Aragón, J.; Martínez-Herrera, A.; Bermúdez-Cruz, R.M.; Bazán, M.L.; Soid-Raggi, G.; Ceja, V.; Coy-Arechavaleta, A.S.; Alemán, V.; Depardón, F.; Montañez, C. EF-hand domains are involved in the differential cellular distribution of dystrophin Dp40. *Neurosci. Lett.* **2015**, *600*, 115–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Sánchez, A.; Aragón, J.; Ceja, V.; Rendon, A.; Montañez, C. Nuclear transport and subcellular localization of the dystrophin Dp71 and Dp40 isoforms in the PC12 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, *630*, 125–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. García-Cruz, C.; Merino-Jiménez, C.; Aragón, J.; Ceja, V.; González-Assad, B.; Reyes-Grajeda, J.P.; Montañez, C. Overexpression of the dystrophins Dp40 and Dp40(L170P) modifies neurite outgrowth and the protein expression profile of PC12 cells. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 1410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Tozawa, T.; Itoh, K.; Yaoi, T.; Tando, S.; Umekage, M.; Dai, H.; Hosoi, H.; Fushiki, S. The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. *Mol. Neurobiol.* **2012**, *45*, 287–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Donandt, T.; Hintze, S.; Krause, S.; Wolf, E.; Schoser, B.; Walter, M.C.; Meinke, P. Isolation and Characterization of Primary DMD Pig Muscle Cells as an In Vitro Model for Preclinical Research on Duchenne Muscular Dystrophy. *Life* **2022**, *12*, 1668. [[CrossRef](#)]
26. Birkrant, D.J.; Bushby, K.; Bann, C.M.; Apkon, S.D.; Blackwell, A.; Colvin, M.K.; Cripe, L.; Herron, A.R.; Kennedy, A.; Kinnett, K.; et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 3: Primary care, emergency management, psychosocial care, and transitions of care across the lifespan. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 445–455. [[CrossRef](#)]
27. Muntoni, F.; Cau, M.; Ganau, A.; Congiu, R.; Arvedi, G.; Mateddu, A.; Marrosu, M.G.; Cianchetti, C.; Realdi, G.; Cao, A.; et al. Brief report: Deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 921–925. [[CrossRef](#)]
28. Aartsma-Rus, A.; Van Deutekom, J.C.T.; Fokkema, I.F.; Van Ommen, G.J.B.; Den Dunnen, J.T. 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* **2006**, *34*, 135–144. [[CrossRef](#)]
29. Naidoo, M.; Anthony, K. Dystrophin Dp71 and the Neuropathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *57*, 1748–1767. [[CrossRef](#)]
30. Tadayoni, R.; Rendon, A.; Soria-Jasso, L.E.; Cisneros, B. Dystrophin Dp71: The smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol. Neurobiol.* **2011**, *45*, 43–60. [[CrossRef](#)]
31. De Brouwer, A.P.; Nabuurs, S.B.; Verhaart, I.E.; Oudakker, A.R.; Hordijk, R.; Yntema, H.G.; Hordijk-Hos, J.M.; Voeseek, K.; De Vries, B.B.; Van Essen, T.; et al. A 3-base pair deletion, c.9711_9713del, in DMD results in intellectual disability without muscular dystrophy. *Eur. J. Hum. Genet.* **2013**, *22*, 480–485. [[CrossRef](#)]
32. Redin, C.; Gerard, B.; Lauer, J.; Herenger, Y.; Muller, J.; Quartier, A.; Masurel-Paulet, A.; Willems, M.; Lesca, G.; El-Chehadeh, S.; et al. Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. *J. Med. Genet.* **2014**, *51*, 724–736. [[CrossRef](#)]
33. Tunnah, D.; Sewry, C.A.; Vaux, D.; Schirmer, E.C.; Morris, G.E. The apparent absence of lamin B1 and emerin in many tissue nuclei is due to epitope masking. *J. Mol. Histol.* **2005**, *36*, 337–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Esteves de Lima, J.; Relaix, F. Master regulators of skeletal muscle lineage development and pluripotent stem cells differentiation. *Cell. Regen.* **2021**, *10*, 31. [[CrossRef](#)]
35. Stirn, M.; Fonteyne, L.M.; Shashikadze, B.; Lindner, M.; Chirivi, M.; Lange, A.; Kaufhold, C.; Mayer, C.; Medugorac, I.; Kessler, B.; et al. A scalable, clinically severe pig model for Duchenne muscular dystrophy. *Dis. Model. Mech.* **2021**, *14*, dmm049285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Zaynitdinova, M.I.; Lavrov, A.V.; Smirnikhina, S.A. Animal models for researching approaches to therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Transgenic Res.* **2021**, *30*, 709–725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Stirn, M.; Fonteyne, L.M.; Shashikadze, B.; Stöckl, J.B.; Kurome, M.; Kefšler, B.; Zakhartchenko, V.; Kemter, E.; Blum, H.; Arnold, G.J.; et al. Pig models for Duchenne muscular dystrophy—from disease mechanisms to validation of new diagnostic and therapeutic concepts. *Neuromuscul. Disord.* **2022**, *32*, 543–556. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

10. Literaturverzeichnis

- Aartsma-Rus, A., I. Fokkema, J. Verschuuren, I. Ginjaar, J. van Deutekom, G. J. van Ommen, and J. T. den Dunnen. 2009. 'Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations', *Hum Mutat*, 30: 293-9.
- Aartsma-Rus, A., J. C. Van Deutekom, I. F. Fokkema, G. J. Van Ommen, and 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: 135-44.
- Aigner, B., S. Renner, B. Kessler, N. Klymiuk, M. Kurome, A. Wunsch, and E. Wolf. 2010. 'Transgenic pigs as models for translational biomedical research', *J Mol Med (Berl)*, 88: 653-64.
- Al-Zaidy, S. A., Z. Sahenk, L. R. Rodino-Klapac, B. Kaspar, and J. R. Mendell. 2015. 'Follistatin Gene Therapy Improves Ambulation in Becker Muscular Dystrophy', *J Neuromuscul Dis*, 2: 185-92.
- Angelini, C., and E. Peterle. 2012. 'Old and new therapeutic developments in steroid treatment in Duchenne muscular dystrophy', *Acta Myol*, 31: 9-15.
- Araki, E., K. Nakamura, K. Nakao, S. Kameya, O. Kobayashi, I. Nonaka, T. Kobayashi, and M. Katsuki. 1997. '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: 492-7.
- Bies, R. D., D. Friedman, R. Roberts, M. B. Perryman, and C. T. Caskey. 1992. 'Expression and localization of dystrophin in human cardiac Purkinje fibers', *Circulation*, 86: 147-53.
- Birnkrant, D. J., K. Bushby, C. M. Bann, B. A. Alman, S. D. Apkon, A. Blackwell, L. E. Case, L. Cripe, S. Hadjiyannakis, A. K. Olson, D. W. Sheehan, J. Bolen, D. R. Weber, L. M. Ward, and D. M. D. Care Considerations Working Group. 2018a. 'Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management', *Lancet Neurol*, 17: 347-61.
- Birnkrant, D. J., K. Bushby, C. M. Bann, S. D. Apkon, A. Blackwell, D. Brumbaugh, L. E. Case, P. R. Clemens, S. Hadjiyannakis, S. Pandya, N. Street, J. Tomezsko, K. R. Wagner, L. M. Ward, D. R. Weber, and D. M. D. Care Considerations Working Group. 2018b. 'Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management', *Lancet Neurol*, 17: 251-67.
- Birnkrant, D. J., K. Bushby, C. M. Bann, S. D. Apkon, A. Blackwell, M. K. Colvin, L. Cripe, A. R. Herron, A. Kennedy, K. Kinnett, J. Naprawa, G. Noritz, J. Poysky, N. Street, C. J. Trout, D. R. Weber, L. M. Ward, and D. M. D. Care Considerations Working Group. 2018c. 'Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 3: primary care, emergency management, psychosocial care, and transitions of care across the lifespan', *Lancet Neurol*, 17: 445-55.

- Bladen, C. L., D. Salgado, S. Monges, M. E. Foncuberta, K. Kekou, K. Kosma, H. Dawkins, L. Lamont, A. J. Roy, T. Chamova, V. Guerguelcheva, S. Chan, L. Korngut, C. Campbell, Y. Dai, J. Wang, N. Barisic, P. Brabec, J. Lahdetie, M. C. Walter, O. Schreiber-Katz, V. Karcagi, M. Garami, V. Viswanathan, F. Bayat, F. Buccella, E. Kimura, Z. Koeks, J. C. van den Bergen, M. Rodrigues, R. Roxburgh, A. Lusakowska, A. Kostera-Pruszczyk, J. Zimowski, R. Santos, E. Neagu, S. Artemieva, V. M. Rasic, D. Vojinovic, M. Posada, C. Bloetzer, P. Y. Jeannet, F. Joncourt, J. Diaz-Manera, E. Gallardo, A. A. Karaduman, H. Topaloglu, R. El Sherif, A. Stringer, A. V. Shatillo, A. S. Martin, H. L. Peay, M. I. Bellgard, J. Kirschner, K. M. Flanigan, V. Straub, K. Bushby, J. Verschuuren, A. Aartsma-Rus, C. Beroud, and H. Lochmuller. 2015. 'The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations', *Hum Mutat*, 36: 395-402.
- Blake, D. J., A. Weir, S. E. Newey, and K. E. Davies. 2002. 'Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle', *Physiol Rev*, 82: 291-329.
- Bulfield, G., W. G. Siller, P. A. Wight, and K. J. Moore. 1984. 'X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81: 1189-92.
- Bushby, K. M., D. Gardner-Medwin, L. V. Nicholson, M. A. Johnson, I. D. Haggerty, N. J. Cleghorn, J. B. Harris, and S. S. Bhattacharya. 1993. 'The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. II. Correlation of phenotype with genetic and protein abnormalities', *J Neurol*, 240: 105-12.
- Campbell, K. P. 1995. 'Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage', *Cell*, 80: 675-9.
- Chamberlain, J. S., J. Metzger, M. Reyes, D. Townsend, and J. A. Faulkner. 2007. 'Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma', *FASEB J*, 21: 2195-204.
- Chesshyre, M., D. Ridout, Y. Hashimoto, Y. Ookubo, S. Torelli, K. Maresh, V. Ricotti, L. Abbott, V. A. Gupta, M. Main, G. Ferrari, A. Kowala, Y. Y. Lin, F. S. Tedesco, M. Scoto, G. Baranello, A. Manzur, Y. Aoki, and F. Muntoni. 2022. 'Investigating the role of dystrophin isoform deficiency in motor function in Duchenne muscular dystrophy', *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 13: 1360-72.
- Clerk, A., G. E. Morris, V. Dubowitz, K. E. Davies, and C. A. Sewry. 1993. 'Dystrophin-related protein, utrophin, in normal and dystrophic human fetal skeletal muscle', *Histochem J*, 25: 554-61.
- Comi, G. P., A. Prella, N. Bresolin, M. Moggio, A. Bardoni, A. Gallanti, G. Vita, A. Toscano, M. T. Ferro, A. Bordoni, and et al. 1994. 'Clinical variability in Becker muscular dystrophy. Genetic, biochemical and immunohistochemical correlates', *Brain*, 117 (Pt 1): 1-14.
- Deconinck, N., J. Tinsley, F. De Backer, R. Fisher, D. Kahn, S. Phelps, K. Davies, and J. M. Gillis. 1997. 'Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice', *Nat Med*, 3: 1216-21.
- Deng, J., J. Zhang, K. Shi, and Z. Liu. 2022. 'Drug development progress in duchenne muscular dystrophy', *Front Pharmacol*, 13: 950651.
- Donandt, T., S. Hintze, S. Krause, E. Wolf, B. Schoser, M. C. Walter, and P. Meinke. 2022. 'Isolation and Characterization of Primary DMD Pig Muscle Cells as an In Vitro Model for Preclinical Research on Duchenne Muscular Dystrophy', *Life (Basel)*, 12(10): 1668.
- Donandt, T., V. Todorow, S. Hintze, A. Graupner, B. Schoser, M. C. Walter, and P. Meinke. 2023. 'Nuclear Small Dystrophin Isoforms during Muscle Differentiation', *Life (Basel)*, 13(6): 1367.

- Duan, D., N. Goemans, S. Takeda, E. Mercuri, and A. Aartsma-Rus. 2021. 'Duchenne muscular dystrophy', *Nat Rev Dis Primers*, 7: 13.
- Echigoya, Y., A. Nakamura, T. Nagata, N. Urasawa, K. R. Q. Lim, N. Trieu, D. Panesar, M. Kuraoka, H. M. Moulton, T. Saito, Y. Aoki, P. Iversen, P. Sazani, R. Kole, R. Maruyama, T. Partridge, S. Takeda, and T. Yokota. 2017. 'Effects of systemic multiexon skipping with peptide-conjugated morpholinos in the heart of a dog model of Duchenne muscular dystrophy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 4213-18.
- Ervasti, J. M. 2007. 'Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy', *Biochim Biophys Acta*, 1772: 108-17.
- European Medicines Agency. EU/3/05/278: Orphan designation for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *EMA Website*. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu305278>. 27. Mai 2014. Aufgerufen am 10. August 2023.
- Finanger, E., K. Vandenborne, R. S. Finkel, H. Lee Sweeney, G. Tennekoon, S. Yum, M. Mancini, P. Bista, A. Nichols, H. Liu, A. Fretzen, and J. M. Donovan. 2019. 'Phase 1 Study of Edasalonexent (CAT-1004), an Oral NF-kappaB Inhibitor, in Pediatric Patients with Duchenne Muscular Dystrophy', *J Neuromuscul Dis*, 6: 43-54.
- Fisher, R., J. M. Tinsley, S. R. Phelps, S. E. Squire, E. R. Townsend, J. E. Martin, and K. E. Davies. 2001. 'Non-toxic ubiquitous over-expression of utrophin in the mdx mouse', *Neuromuscul Disord*, 11: 713-21.
- Fox, H., L. Millington, I. Mahabeer, and H. van Ruiten. 2020. 'Duchenne muscular dystrophy', *BMJ*, 368: 17012.
- Fukada, S., D. Morikawa, Y. Yamamoto, T. Yoshida, N. Sumie, M. Yamaguchi, T. Ito, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, K. Tsujikawa, and H. Yamamoto. 2010. 'Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes', *Am J Pathol*, 176: 2414-24.
- Gao, Q. Q., and E. M. McNally. 2015. 'The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy', *Compr Physiol*, 5: 1223-39.
- Gilchrist, S. C., M. P. Ontell, S. Kochanek, and P. R. Clemens. 2002. 'Immune response to full-length dystrophin delivered to Dmd muscle by a high-capacity adenoviral vector', *Mol Ther*, 6: 359-68.
- Guiraud, S., A. Aartsma-Rus, N. M. Vieira, K. E. Davies, G. J. van Ommen, and L. M. Kunkel. 2015a. 'The Pathogenesis and Therapy of Muscular Dystrophies', *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 16: 281-308.
- Guiraud, S., H. Chen, D. T. Burns, and K. E. Davies. 2015b. 'Advances in genetic therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy', *Exp Physiol*, 100: 1458-67.
- Guiraud, S., and K. E. Davies. 2017. 'Pharmacological advances for treatment in Duchenne muscular dystrophy', *Curr Opin Pharmacol*, 34: 36-48.
- Guiraud, S., B. Edwards, A. Babbs, S. E. Squire, A. Berg, L. Moir, M. J. Wood, and K. E. Davies. 2019. 'The potential of utrophin and dystrophin combination therapies for Duchenne muscular dystrophy', *Hum Mol Genet*, 28: 2189-200.
- Guo, L. J., J. H. Soslow, A. K. Bettis, P. P. Nghiem, K. J. Cummings, M. W. Lenox, M. W. Miller, J. N. Kornegay, and C. F. Spurney. 2019. 'Natural History of Cardiomyopathy in Adult Dogs With Golden Retriever Muscular Dystrophy', *J Am Heart Assoc*, 8: e012443.
- Helliwell, T. R., N. T. Man, G. E. Morris, and K. E. Davies. 1992. 'The dystrophin-related protein, utrophin, is expressed on the sarcolemma of regenerating human skeletal muscle fibres in dystrophies and inflammatory myopathies', *Neuromuscul Disord*, 2: 177-84.

- Hendriksen, A. M. Aartsma-Rus, Jgm Verschuuren, E. H. Niks, M. J. T. Reinders, H. E. Kan, and B. P. F. Lelieveldt. 2017. 'Timing and localization of human dystrophin isoform expression provide insights into the cognitive phenotype of Duchenne muscular dystrophy', *Sci Rep*, 7: 12575.
- Hiebeler, M., S. Thiele, P. Reilich, G. Bernert, and M. C. Walter. 2023. 'Time to diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in Austria and Germany', *Sci Rep*, 13: 179.
- Hoffman, E. P., B. D. Schwartz, L. J. Mengle-Gaw, E. C. Smith, D. Castro, J. K. Mah, C. M. McDonald, N. L. Kuntz, R. S. Finkel, M. Guglieri, K. Bushby, M. Tulinius, Y. Nevo, M. M. Ryan, R. Webster, A. L. Smith, L. P. Morgenroth, A. Arrieta, M. Shimony, C. Siener, M. Jaros, P. Shale, J. M. McCall, K. Nagaraju, J. van den Anker, L. S. Conklin, A. Cnaan, H. Gordish-Dressman, J. M. Damsker, P. R. Clemens, and Group Cooperative International Neuromuscular Research. 2019. 'Vamorolone trial in Duchenne muscular dystrophy shows dose-related improvement of muscle function', *Neurology*, 93: e1312-e23.
- Ishizaki, M., M. Kobayashi, K. Adachi, T. Matsumura, and E. Kimura. 2018. 'Female dystrophinopathy: Review of current literature', *Neuromuscul Disord*, 28: 572-81.
- Klymiuk, N., 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. Lochmüller, M. C. Walter, and E. Wolf. 2013. 'Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle', *Hum Mol Genet*, 22: 4368-82.
- Klymiuk, N., F. Seeliger, Y. M. Bohlooly, A. Blutke, D. G. Rudmann, and E. Wolf. 2016. 'Tailored Pig Models for Preclinical Efficacy and Safety Testing of Targeted Therapies', *Toxicol Pathol*, 44: 346-57.
- Konig, K., A. Pechmann, S. Thiele, M. C. Walter, D. Schorling, A. Tassoni, H. Lochmüller, C. Müller-Reible, and J. Kirschner. 2019. 'De-duplicating patient records from three independent data sources reveals the incidence of rare neuromuscular disorders in Germany', *Orphanet J Rare Dis*, 14: 152.
- Kornegay, J. N., J. R. Bogan, D. J. Bogan, M. K. Childers, and R. W. Grange. 2011. 'Golden retriever muscular dystrophy (GRMD): Developing and maintaining a colony and physiological functional measurements', *Methods Mol Biol*, 709: 105-23.
- Kornegay, J. N., J. R. Bogan, D. J. Bogan, M. K. Childers, J. Li, P. Nghiem, D. A. Detwiler, C. A. Larsen, R. W. Grange, R. K. Bhavaraju-Sanka, S. Tou, B. P. Keene, J. F. Howard, Jr., J. Wang, Z. Fan, S. J. Schatzberg, M. A. Styner, K. M. Flanigan, X. Xiao, and E. P. Hoffman. 2012. 'Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies', *Mamm Genome*, 23: 85-108.
- Kornegay, J. N., S. M. Tuler, D. M. Miller, and D. C. Levesque. 1988. 'Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs', *Muscle Nerve*, 11: 1056-64.
- Kupatt, C., A. Windisch, A. Moretti, E. Wolf, W. Wurst, and M. C. Walter. 2021. 'Genome editing for Duchenne muscular dystrophy: a glimpse of the future?', *Gene Ther*.
- Love, D. R., D. F. Hill, G. Dickson, N. K. Spurr, B. C. Byth, R. F. Marsden, F. S. Walsh, Y. H. Edwards, and K. E. Davies. 1989. 'An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin', *Nature*, 339: 55-8.
- Lunney, J. K., A. Van Goor, K. E. Walker, T. Hailstock, J. Franklin, and C. Dai. 2021. 'Importance of the pig as a human biomedical model', *Sci Transl Med*, 13: eabd5758.
- Markati, T., M. Oskoui, M. A. Farrar, T. Duong, N. Goemans, and L. Servais. 2022. 'Emerging therapies for Duchenne muscular dystrophy', *Lancet Neurol*, 21: 814-29.

- Mau, M., N. Oksbjerg, and C. Rehfeldt. 2008. 'Establishment and conditions for growth and differentiation of a myoblast cell line derived from the semimembranosus muscle of newborn piglets', *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 44: 1-5.
- McDonald, C. M., 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, Group Clinical Evaluator Training, and Act Dmd Study Group. 2017. 'Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial', *Lancet*, 390: 1489-98.
- McDonald, C. M., F. Muntoni, V. Penematsa, J. Jiang, A. Kristensen, F. Bibbiani, E. Goodwin, H. Gordish-Dressman, L. Morgenroth, C. Werner, J. Li, R. Able, P. Trifillis, M. Tulinius, and investigators Study. 2022. 'Ataluren delays loss of ambulation and respiratory decline in nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy patients', *J Comp Eff Res*, 11: 139-55.
- Mendell, J. R., K. Campbell, L. Rodino-Klapac, Z. Sahenk, C. Shilling, S. Lewis, D. Bowles, S. Gray, C. Li, G. Galloway, V. Malik, B. Coley, K. R. Clark, J. Li, X. Xiao, J. Samulski, S. W. McPhee, R. J. Samulski, and C. M. Walker. 2010. 'Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy', *N Engl J Med*, 363: 1429-37.
- Mendell, J. R., Z. Sahenk, V. Malik, A. M. Gomez, K. M. Flanigan, L. P. Lowes, L. N. Alfano, K. Berry, E. Meadows, S. Lewis, L. Braun, K. Shontz, M. Rouhana, K. R. Clark, X. Q. Rosales, S. Al-Zaidy, A. Govoni, L. R. Rodino-Klapac, M. J. Hogan, and B. K. Kaspar. 2015. 'A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy', *Mol Ther*, 23: 192-201.
- Mendell, J. R., C. Shilling, N. D. Leslie, K. M. Flanigan, R. al-Dahhak, J. Gastier-Foster, K. Kneile, D. M. Dunn, B. Duval, A. Aoyagi, C. Hamil, M. Mahmoud, K. Roush, L. Bird, C. Rankin, H. Lilly, N. Street, R. Chandrasekar, and R. B. Weiss. 2012. 'Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy', *Ann Neurol*, 71: 304-13.
- Metzger, K., A. Tuchscherer, M. F. Palin, S. Ponsuksili, and C. Kalbe. 2020. 'Establishment and validation of cell pools using primary muscle cells derived from satellite cells of pig skeletal muscle', *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 56: 193-99.
- Moat, S. J., D. M. Bradley, R. Salmon, A. Clarke, and L. Hartley. 2013. 'Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales (UK)', *Eur J Hum Genet*, 21: 1049-53.
- Morales, M. G., J. Gutierrez, C. Cabello-Verrugio, D. Cabrera, K. E. Lipson, R. Goldschmeding, and E. Brandan. 2013. 'Reducing CTGF/CCN2 slows down mdx muscle dystrophy and improves cell therapy', *Hum Mol Genet*, 22: 4938-51.
- Moretti, A., L. Fonteyne, F. Giesert, P. Hoppmann, A. B. Meier, T. Bozoglu, A. Baehr, C. M. Schneider, D. Sinnecker, K. Klett, T. Frohlich, 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, and C. Kupatt. 2020. 'Somatic gene editing ameliorates skeletal and cardiac muscle failure in pig and human models of Duchenne muscular dystrophy', *Nat Med*, 26: 207-14.
- Morin, A., A. Stantzou, O. N. Petrova, J. Hildyard, T. Tensorer, M. Matouk, M. V. Petkova, I. Richard, T. Manoliu, A. Goyenville, S. Falcone, M. Schuelke, C. Laplace-Builhe, R. J. Piercy, L. Garcia, and H. Amthor. 2023. 'Dystrophin myonuclear domain restoration governs treatment efficacy in dystrophic muscle', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 120: e2206324120.

- Muntoni, F., B. Tejura, S. Spinty, H. Roper, I. Hughes, G. Layton, K. E. Davies, S. Harriman, and J. Tinsley. 2019. 'A Phase 1b Trial to Assess the Pharmacokinetics of Ezutromid in Pediatric Duchenne Muscular Dystrophy Patients on a Balanced Diet', *Clin Pharmacol Drug Dev*, 8: 922-33.
- Muntoni, F., S. Torelli, and A. Ferlini. 2003. 'Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes', *Lancet Neurol*, 2: 731-40.
- Murphy, K. T., J. G. Ryall, S. M. Snell, L. Nair, R. Koopman, P. A. Krasney, C. Ibebunjo, K. S. Holden, P. M. Loria, C. T. Salatto, and G. S. Lynch. 2010. 'Antibody-directed myostatin inhibition improves diaphragm pathology in young but not adult dystrophic mdx mice', *Am J Pathol*, 176: 2425-34.
- Naidoo, M., and K. Anthony. 2020. 'Dystrophin Dp71 and the Neuropathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy', *Mol Neurobiol*, 57: 1748-67.
- Nakamura, A., N. Shiba, D. Miyazaki, H. Nishizawa, Y. Inaba, N. Fueki, R. Maruyama, Y. Echigoya, and T. Yokota. 2017. 'Comparison of the phenotypes of patients harboring in-frame deletions starting at exon 45 in the Duchenne muscular dystrophy gene indicates potential for the development of exon skipping therapy', *J Hum Genet*, 62: 459-63.
- Nakamura, A., and S. Takeda. 2011. 'Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications', *J Biomed Biotechnol*, 2011: 184393.
- Nguyen, T. M., J. M. Ellis, D. R. Love, K. E. Davies, K. C. Gatter, G. Dickson, and G. E. Morris. 1991. 'Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines', *J Cell Biol*, 115: 1695-700.
- Regensburger, A. P., L. M. Fonteyne, J. Jungert, A. L. Wagner, T. Gerhalter, A. M. Nagel, R. Heiss, F. Flenkenthaler, M. Qurashi, M. F. Neurath, N. Klymiuk, E. Kemter, T. Frohlich, M. Uder, J. Woelfle, W. Rascher, R. Trollmann, E. Wolf, M. J. Waldner, and F. Knieling. 2019. 'Detection of collagens by multispectral optoacoustic tomography as an imaging biomarker for Duchenne muscular dystrophy', *Nat Med*, 25: 1905-15.
- Ryder, S., R. M. Leadley, N. Armstrong, M. Westwood, S. de Kock, T. Butt, M. Jain, and J. Kleijnen. 2017. 'The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review', *Orphanet J Rare Dis*, 12: 79.
- Saito, T., M. Kawai, E. Kimura, K. Ogata, T. Takahashi, M. Kobayashi, H. Takada, S. Kuru, T. Mikata, T. Matsumura, N. Yonemoto, H. Fujimura, and S. Sakoda. 2017. 'Study of Duchenne muscular dystrophy long-term survivors aged 40 years and older living in specialized institutions in Japan', *Neuromuscul Disord*, 27: 107-14.
- Sarkozy, A., R. Quinlivan, J. P. Bourke, A. Ferlini, and Enmc rd Workshop Study Group. 2023. '263rd ENMC International Workshop: Focus on female carriers of dystrophinopathy: refining recommendations for prevention, diagnosis, surveillance, and treatment. Hoofddorp, The Netherlands, 13-15 May 2022', *Neuromuscul Disord*, 33: 274-84.
- Schofield, J., D. Houzelstein, K. Davies, M. Buckingham, and Y. H. Edwards. 1993. 'Expression of the dystrophin-related protein (utrophin) gene during mouse embryogenesis', *Dev Dyn*, 198: 254-64.
- Schreiber-Katz, O., C. Klug, S. Thiele, E. Schorling, J. Zowe, P. Reilich, K. H. Nagels, and M. C. Walter. 2014. 'Comparative cost of illness analysis and assessment of health care burden of Duchenne and Becker muscular dystrophies in Germany', *Orphanet J Rare Dis*, 9: 210.
- Sebastian, S., L. Goulding, S. V. Kuchipudi, and K. C. Chang. 2015. 'Extended 2D myotube culture recapitulates postnatal fibre type plasticity', *BMC Cell Biol*, 16: 23.

- Sharp, N.J.H., 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, R.J. Bartlett. 1992. 'An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy', *Genomics*, 13(1): 115-121.
- Shieh, P. B. 2018. 'Emerging Strategies in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy', *Neurotherapeutics*, 15: 840-48.
- Shimatsu, Y., K. Katagiri, T. Furuta, M. Nakura, Y. Tanioka, K. Yuasa, M. Tomohiro, J. N. Kornegay, I. Nonaka, and S. Takeda. 2003. 'Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ)', *Exp Anim*, 52: 93-7.
- Shimatsu, Y., M. Yoshimura, K. Yuasa, N. Urasawa, M. Tomohiro, M. Nakura, M. Tanigawa, A. Nakamura, and S. Takeda. 2005. 'Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDJ', *Acta Myol*, 24: 145-54.
- Squire, S., J. M. Raymackers, C. Vandebrouck, A. Potter, J. Tinsley, R. Fisher, J. M. Gillis, and K. E. Davies. 2002. 'Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system', *Hum Mol Genet*, 11: 3333-44.
- Stirm, M., L. M. Fonteyne, B. Shashikadze, M. Lindner, M. Chirivi, A. Lange, C. Kaufhold, C. Mayer, I. Medugorac, B. Kessler, M. Kurome, V. Zakhartchenko, A. Hinrichs, E. Kemter, S. Krause, R. Wanke, G. J. Arnold, G. Wess, H. Nagashima, M. Hrabe de Angelis, F. Flenkenthaler, L. A. Kobelke, C. Bearzi, R. Rizzi, A. Bahr, S. Reese, K. Matiasek, M. C. Walter, C. Kupatt, S. Ziegler, P. Bartenstein, T. Frohlich, N. Klymiuk, A. Blutke, and E. Wolf. 2021. 'A scalable, clinically severe pig model for Duchenne muscular dystrophy', *Dis Model Mech*, 14.
- Stirm, M., L. M. Fonteyne, B. Shashikadze, J. B. Stockl, M. Kurome, B. Kessler, V. Zakhartchenko, E. Kemter, H. Blum, G. J. Arnold, K. Matiasek, R. Wanke, W. Wurst, H. Nagashima, F. Knieling, M. C. Walter, C. Kupatt, T. Frohlich, N. Klymiuk, A. Blutke, and E. Wolf. 2022. 'Pig models for Duchenne muscular dystrophy - from disease mechanisms to validation of new diagnostic and therapeutic concepts', *Neuromuscul Disord*, 32: 543-56.
- Stirm, M., B. Shashikadze, A. Blutke, E. Kemter, A. Lange, J. B. Stockl, F. Jaudas, L. Laane, M. Kurome, B. Kessler, V. Zakhartchenko, A. Bahr, N. Klymiuk, H. Nagashima, M. C. Walter, W. Wurst, C. Kupatt, T. Frohlich, and E. Wolf. 2023. 'Systemic deletion of DMD exon 51 rescues clinically severe Duchenne muscular dystrophy in a pig model lacking DMD exon 52', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 120: e2301250120.
- Taylor, P. J., G. A. Betts, S. Maroulis, C. Gilissen, R. L. Pedersen, D. R. Mowat, H. M. Johnston, and M. F. Buckley. 2010. 'Dystrophin gene mutation location and the risk of cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy', *PLoS One*, 5: e8803.
- Tinsley, J., N. Deconinck, R. Fisher, D. Kahn, S. Phelps, J. M. Gillis, and K. Davies. 1998. 'Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice', *Nat Med*, 4: 1441-4.
- Torelli, S., A. Ferlini, L. Obici, C. Sewry, and F. Muntoni. 1999. 'Expression, regulation and localisation of dystrophin isoforms in human foetal skeletal and cardiac muscle', *Neuromuscul Disord*, 9: 541-51.
- Urasawa, N., M. R. Wada, N. Machida, K. Yuasa, Y. Shimatsu, Y. Wakao, S. Yuasa, T. Sano, I. Nonaka, A. Nakamura, and S. Takeda. 2008. 'Selective vacuolar degeneration in dystrophin-deficient canine Purkinje fibers despite preservation of dystrophin-associated proteins with overexpression of Dp71', *Circulation*, 117: 2437-48.

- U.S. Food and Drug Administration. FDA Approves First Gene Therapy for Treatment of Certain Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *FDA Website*. Verfügbar unter: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapy-treatment-certain-patients-duchenne-muscular-dystrophy>. 22. Juni 2023. Aufgerufen am 10. August 2023.
- Valentine, B. A., B. J. Cooper, A. de Lahunta, R. O'Quinn, and J. T. Blue. 1988. 'Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies', *J Neurol Sci*, 88: 69-81.
- Vandewalle, J., A. Luybaert, K. De Bosscher, and C. Libert. 2018. 'Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids', *Trends Endocrinol Metab*, 29: 42-54.
- Verdera, H. C., K. Kuranda, and F. Mingozzi. 2020. 'AAV Vector Immunogenicity in Humans: A Long Journey to Successful Gene Transfer', *Mol Ther*, 28: 723-46.
- Verhaart, I. E. C., and A. Aartsma-Rus. 2019. 'Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy', *Nat Rev Neurol*, 15: 373-86.
- Wagner, K. R., H. Z. Abdel-Hamid, J. K. Mah, C. Campbell, M. Guglieri, F. Muntoni, Y. Takeshima, C. M. McDonald, A. Kostera-Pruszyk, P. Karachunski, R. J. Butterfield, E. Mercuri, C. Fiorillo, E. S. Bertini, C. Tian, J. Statland, A. B. Sadosky, V. S. Purohit, S. P. Sherlock, J. P. Palmer, M. Binks, L. Charnas, S. Marraffino, and B. L. Wong. 2020. 'Randomized phase 2 trial and open-label extension of domagrozumab in Duchenne muscular dystrophy', *Neuromuscul Disord*, 30: 492-502.
- Walmsley, G. L., 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, and 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: e8647.
- Walter, M. C. 2018. 'Molekulare Therapien von Muskeldystrophien.' in (Thieme Verlag: Stuttgart).
- Walter, M. C., G. Bernert, R. Bittner, T. Fischbach, J. Kirschner, and C. Köhler. 2019. 'Frühdiagnose der Duchenne Muskeldystrophie – Entwicklungsverzögerung kann wegweisend sein', *Kinder- und Jugendarzt*, 50: 100-04.
- Walter, M. C., and P. Reilich. 2017. 'Recent developments in Duchenne muscular dystrophy: facts and numbers', *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 8: 681-85.
- Weir, A. P., E. A. Burton, G. Harrod, and K. E. Davies. 2002. 'A- and B-utrophin have different expression patterns and are differentially up-regulated in mdx muscle', *J Biol Chem*, 277: 45285-90.
- Wells, D. J. 2018. 'Tracking progress: an update on animal models for Duchenne muscular dystrophy', *Dis Model Mech*, 11.
- Wolf, Eckhard, Alexander Kind, Bernhard Aigner, and Angelika Schnieke. 2023. 'Gentechnisch veränderte Großtiere in der Biomedizin.' in Heiner Niemann and Christine Wrenzycki (eds.), *Biotechnologie bei Nutztieren 2: Aufkommende Züchtungstechnologien* (Springer International Publishing: Cham).
- Yucel, N., A. C. Chang, J. W. Day, N. Rosenthal, and H. M. Blau. 2018. 'Humanizing the mdx mouse model of DMD: the long and the short of it', *NPJ Regen Med*, 3: 4.
- Yugeta, N., N. Urasawa, Y. Fujii, M. Yoshimura, K. Yuasa, M. R. Wada, M. Nakura, Y. Shimatsu, M. Tomohiro, A. Takahashi, N. Machida, Y. Wakao, A. Nakamura, and S. Takeda. 2006. 'Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ): electrocardiographic, echocardiographic, and morphologic studies', *BMC Cardiovasc Disord*, 6: 47.
- Zaynitdinova, M. I., A. V. Lavrov, and S. A. Smirnikhina. 2021. 'Animal models for researching approaches to therapy of Duchenne muscular dystrophy', *Transgenic Res*, 30: 709-25.

- Zhang, S., D. Qin, L. Wu, M. Li, L. Song, C. Wei, C. Lu, X. Zhang, S. Hong, M. Ma, S. Wu, and One Doctor National Dmd Research Network of "One City. 2021. 'Genotype characterization and delayed loss of ambulation by glucocorticoids in a large cohort of patients with Duchenne muscular dystrophy', *Orphanet J Rare Dis*, 16: 188.
- Ziegler, Andreas, Maggie C. Walter, and Benedikt E. Schoser. 2023. 'Molekulare Therapien: Gegenwart und Zukunft bei neuromuskulären Erkrankungen', *Der Nervenarzt*, 94: 473-87.

Danksagung

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

Mein ganz herzlicher und aufrichtiger Dank gilt vor allem meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Maggie C. Walter, für die Möglichkeit der Promotion in Ihrem Forschungsbe-
reich und Ihrer großzügigen Unterstützung während meiner gesamten Forschungszeit. Sie ist für mich ein Role-Model: Eine bewundernswerte Frau, die mir vorgelebt hat, wie „frau“ Karriere und Familie vorzüglich und hoch erfolgreich verbinden kann. Sie stand mir immer mit einem offenen Ohr zur Seite. Mein ganz großer Dank für alles, Maggie!

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer, Herrn PD Dr. Peter Meinke, für die exzellente fachliche Führung, aber vor allem auch die moralische und persönliche Unterstützung während meiner Forschungszeit. Er hat mir die Augen für die Schönheit der Wissenschaft wahrlich geöffnet und mir vorgelebt, wie man in der medizinischen Forschung als „Nicht-Mediziner“ Karriere machen kann. Danke sehr, Peter!

Danken möchte ich auch meiner Betreuerin während meiner ersten Jahre am Friedrich-Baur-Institut, Frau PD Dr. Dr. Sabine Krause. Sie hat die Basis meiner Forschungsarbeit gelegt und mir mit sehr viel Geduld und Fachwissen die Grundlagen für meine Projekte vermittelt. Mit ihrer liebenswerten Art hat sie mich nicht nur fachlich sehr viel für mein weiteres Leben gelehrt. Danke, Sabine!

Ein ganz großer Dank gilt auch Dr. Stefan Hintze. Er stand mir bei all meinen Versuchen mit einem offenen Ohr oder einer helfenden Hand zur Seite, beriet mich immer und immer wieder hervorragend und half mir „aus der Patsche“, wenn ich bei meinen Projekten mal wieder „völlig im Dunkeln tappte“. Deine Hilfe weiß und wusste ich immer sehr zu schätzen, Stefan, danke!

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei allen MTAs des Friedrich-Baur-Instituts bedanken. Insbesondere bei Alex und Lejla, ihr habt meinen Alltag im Labor immer versüßt und habt mir zahlreiche Male methodisch, aber auch praktisch bei meinen Versuchen sehr geholfen, danke euch dafür!

Ein großes Danke geht auch an Maria und Julia, die mir beide zu Beginn meiner For-
schungstätigkeit die Grundlagen des Laborbetriebs, der Zellkultur und die „Kunst des Western Blots“ lehrten und mich stets bei jeglichen Fragen berieten. Danke euch!

Aber auch allen anderen Mitarbeitern und Kollegen im Friedrich-Baur-Institut gilt mein großer Dank! Ich wurde herzlichst aufgenommen, jegliche Fragen wurden mir immer helfend beantwortet und ein motivierender oder auch nur unterhaltsamer Plausch mit ihnen auf dem Flur des FBIs war immer eine willkommene Abwechslung im Labor-Alltag.

Herzlich bedanken möchte ich mich zudem bei Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf vom Genzentrum der LMU München und seinen MitarbeiterInnen, die die DMDpigs möglich gemacht haben. Ganz besonders möchte ich mich bei Lina bedanken, die nicht nur mit viel Hingabe und Aufwand die DMDpigs betreut hat, sondern mich bei ihrem Ableben auch immer rechtzeitig anrief, mich in die Probenentnahme einführte und mir später die Tiere und Räumlichkeiten zur Verfügung stellte.

Dankend erwähnen möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Benedikt Schoser, der mir persönlich mit Rat zur Seite stand, aber vor allem, weil er in seinem Forschungsteam die Kapazitäten zur Verfügung stellte, dass meine Betreuung auch nach dem Ausscheiden von Frau PD Dr. Dr. Sabine Krause gewährleistet wurde. Das hat mir auf den letzten entscheidenden Metern meiner Dissertation sehr geholfen und dafür bin ich ihm sehr dankbar!

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Kollegin, Vanessa. Es tat gut mit dir immer mal wieder über die „Begleiterscheinungen“ einer Doktorarbeit sprechen zu können, aber auch dein fachlicher Rat und deine Arbeit für unser Paper haben mich positiv beeinflusst!

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich und in Worten kaum ausdrückbar bei meinen Eltern, Ute und Dietz, bedanken! Ohne sie wäre ich nie so weit gekommen, sie standen immer hinter mir und haben mir den langen Weg meiner Ausbildung ermöglicht. Sie haben mir eine traumhafte Kindheit beschert, mir alle Türen geöffnet, um mein heutiges „Ich“ zu entwickeln, und mir alles erfüllt, was ich mir nur wünschen konnte. Dafür bin ich euch unendlich dankbar und hoffe, ich mache euch mit dem Abschluss meiner Promotion ein bisschen stolz. Danke euch!

Mein abschließender Dank geht an meinen Partner und Freund, Shadi. Er hat - wie wohl keine andere Person - alle meine Höhen und Tiefen auf dem Weg zur Promotion miterlebt. Immer stand er hinter mir, hielt mir wo er nur konnte den Rücken frei und half mir meine privaten Ziele, u. a. mit meiner Pferdezucht, parallel während dieser Jahre ebenfalls weiterzuentwickeln. Ich kann nicht in Worte fassen, was er alles für mich getan hat und wie er mich auf dem Weg zu meiner Promotion unterstützt hat, aber ich hoffe, er weiß, wie dankbar ich ihm dafür bin und immer sein werde!