

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Schweine

Leiter: Univ. Prof. Dr. med.vet. Andrea Ladinig Dipl. ECPHM

**Erhebung zum Vorkommen von Fatty Muscular Dystrophy in österreichischen
Schlachtschweinen**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von Carolin Schöner

Wien, im April 2020

Betreuer:

Dr. med. vet. Lukas Schwarz

Begutachter:

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei meinem Betreuer Dr. med. vet. Lukas Schwarz bedanken, der mich mit viel Geduld und Hilfsbereitschaft bei der Arbeit unterstützte und sich immer Zeit für Fragen nahm.

Vielen Dank auch an Herrn Mag. med. vet. Rene Brunthaler und Frau BSc. Madeleine Lunadri vom Institut für Pathologie, für die Durchführung der pathohistologischen Untersuchungen und die genauen Erklärungen und Bilder dazu. Des Weiteren bedanke ich mich bei Drⁱⁿ med. vet. Barbara Wallner vom Institut für Tierzucht und Genetik für die Durchführung der PCR zur Geschlechtsbestimmung und dem Zusenden von hilfreichem Infomaterial für die Diplomarbeit. Auch bei Frau Univ.Prof. Dr. Andrea Ladinig möchte ich mich für das abschließende Korrekturlesen und die hilfreichen Anmerkungen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt den fleischbeschauenden Tierärzten, die an der Befragung teilgenommen haben und Schlachtkörper für die weitere Untersuchung an die Vetmeduni Vienna geschickt haben. Ohne diese wäre das Entstehen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1. Dystrophin und Utrophin.....	3
2.1.1. Dystrophin-Gen	3
2.1.2. Dystrophin-Protein	4
2.1.3. Utrophin.....	7
2.2. Molekulare Grundlagen der Muskeldystrophie.....	9
2.2.1. Mutationen im Dystrophin-Gen	9
2.2.2. Leserahmen-Theorie.....	9
2.2.3. Zusammenhang zwischen Genotyp und Krankheitsausprägung	10
2.3. Pathogenese	12
2.4. Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie in der Human- und Veterinärmedizin.....	15
2.4.1. Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie in der Humanmedizin	15
2.4.2. Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie in der Veterinärmedizin.....	17
2.4.2.1. Tiermodelle.....	17
2.4.2.2. Spontanes Auftreten beim Schwein.....	19
2.4.2.3. Zusammenhang mit dem porzinen Stresssyndrom.....	21
3. Material und Methoden	23
3.1. Schlachtkörper	23
3.2. Histopathologische und immunhistochemische Untersuchung.....	23
3.3. DNA Isolierung und Polymerase-Kettenreaktion zur Geschlechtsbestimmung	26
3.4. Befragung der Tierärzte.....	28
4. Ergebnisse.....	32
4.1. Histopathologische und immunhistochemische Untersuchung.....	32

4.2. Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktion zur Geschlechtsbestimmung.....	34
4.3. Ergebnisse der Befragung.....	35
5. Diskussion	38
6. Zusammenfassung	42
7. Summary.....	44
8. Literatur	46
9. Anhang	49
9. 1. Abkürzungsverzeichnis	49
9. 2. Abbildungsverzeichnis	51

1. Einleitung und Fragestellung

Diese Arbeit befasst sich mit der fettigen Muskeldystrophie beim österreichischen Schlachtschwein. Die Erkrankung wurde erstmals 2013 von Horiuchi et al. in Japan beschrieben. Bei der Lebendtieruntersuchung schienen die Schweine vollkommen gesund zu sein, jedoch fielen bei der Untersuchung des Fleisches Abnormitäten, wie eine blasse Farbe und starke Fetteinlagerungen im Muskel, auf. Diese Abweichungen führten zur Einstufung des Schlachtkörpers als genussuntauglich. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, dass es diffuse Fetteinlagerungen im Skelettmuskel mit Degeneration und Regeneration der übrigen Muskelfasern gab. Hinweise auf eine neurologische Atrophie, traumatische Degeneration oder andere den Muskel betreffende Krankheiten wurden nicht gefunden. Die Immunfluoreszenz zeigte eine schwache Anfärbbarkeit des Proteins Dystrophin und die geschlechtsbestimmende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestätigte, dass es sich um ein männliches Tier handelte. Zusammenfassend wiesen die Ergebnisse der Untersuchungen eine starke Analogie zu der beim Menschen vorkommenden Krankheit Becker-Muskeldystrophie (BMD) auf. Die BMD, wie auch die Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) zählen zu den an das X-Chromosom gebundenen Mutationen, welche zu unterschiedlich stark ausgeprägten Muskeldystrophien führen (Horiuchi et al. 2014). Durch die Mutationen am Dystrophin-Gen kommt es bei der DMD zum Fehlen des Proteins Dystrophin und damit zu einer schweren klinischen Erkrankung. Bei BMD wird das Protein stark verkürzt produziert wodurch sich ein milderes Krankheitsbild ergibt (Koenig et al. 1989).

Das Protein Dystrophin kommt im Sarkolemm zusammen mit anderen Proteinen vor und verbindet das zytoplasmatische Aktin mit der Zellmembran. Es ist ein essentieller Bestandteil für den Vorgang der Muskelkontraktion (Blake et al. 2002).

Im Zuge einer Einsendung von Muskelfleisch eines österreichischen Schweines mit auffälligen Veränderungen, konnte diese Form der Muskeldegeneration erstmals in Österreich diagnostiziert werden. Im Rahmen dieser Diplomarbeit soll eine erste Erhebung zum Vorkommen der Erkrankung in Österreich durchgeführt werden und zwei weitere Fälle aus der Steiermark sollen inklusive histologischer Untersuchung und Geschlechts-PCR genauer dargestellt werden, um die wirtschaftliche Bedeutung und die Ausprägungen der Krankheit einschätzen zu können. Aufbauend auf den Ergebnissen können weitere Studien folgen, die

sich einerseits mit der fleischhygienischen Unbedenklichkeit und andererseits mit der züchterischen Selektion beschäftigen.

2. Literaturübersicht

2.1. Dystrophin und Utrophin

2.1.1. Dystrophin-Gen

Das Gen, welches für das Protein Dystrophin codiert, befindet sich beim Menschen auf dem X-Chomosome an der Stelle Xp21 (Blake et al. 2002). Das Genom des Schweines ähnelt dem menschlichen sehr, sodass man davon ausgehen kann, dass die folgenden Informationen auf das Schwein übertragen werden können (Selsby et al. 2015). Das Dystrophin-Gen besteht aus 79 Exons und umfasst ungefähr zweieinhalb Megabasenpaare (Mb). Die daraus resultierende mRNA hat eine Größe von 14 Kilobasenpaaren (kb). Exprimiert wird das Gen durch gewebespezifische Promotoren vor allem in der Skelettmuskulatur, in der Herzmuskulatur und zu geringen Teilen auch im Gehirn. Durch vier interne Promotoren werden kürzere Transkripte des Dystrophin-Gens produziert, die zur Entstehung von verkürzten Isoformen führen. Diese Isoformen treten in der Retina, im Gehirn, in den Schwannzellen und als generell vorhandene Proteine auf. Ihre Funktion ist noch nicht vollständig geklärt, aber sicher ist, dass sie an der Stabilisation und Funktion von nicht muskulären dystrophinartigen Proteinen beteiligt sind (Blake et al. 2002). Dass diese Isoformen zum Teil auch im zentralen Nervensystem vorkommen, erklärt die kognitive Beeinträchtigung, die bei BMD und DMD beim Menschen neben den sonst hauptsächlich muskulären Symptomen, auftritt (Wilson et al. 2017).

Am Dystrophin-Gen kann man vier Regionen unterscheiden, die für die vier Hauptdomänen des daraus resultierenden Proteins codieren: Den Aminoterminus, die zentrale Stabdomäne, die cysteinreiche Domäne und den Carboxyterminus (Ohlendieck und Swandulla 2017). Je nach Lokalisation einer Mutation kommt es zu verschiedenen Krankheitsausprägungen (Abbildung (Abb.) 1) (Koenig et al. 1989). Genauer wird auf die Mutationen und ihre Auswirkungen in den folgenden Kapiteln eingegangen.

Die verschiedenen Domänen codieren für unterschiedliche Abschnitte des Proteins, welche bestimmte Funktionen erfüllen. Der Aminoterminus und eine Region der zentralen Stabdomäne bilden Regionen des Dystrophins, welche eine Bindung mit dem zytoskelettalen

Aktin eingehen. Die aus 24 Wiederholungseinheiten bestehende zentrale Stabdomäne führt zur Bildung der flexiblen, stangenartigen Struktur von Dystrophin. Am Ende dieser Wiederholungen befindet sich der Code für die sogenannte WW-Domäne. Ein Teil dieser Proteindomäne bildet Bindungsstellen für prolinreiche Substrate. Beim Dystrophin ist das die Bindungsstelle für die prolinreiche zytoplasmatische Seite von β -Dystroglykan. In der cysteinreichen Region ist das Aminosäuremotiv EF-Hand codiert. Dieses ist für die Bindung intrazellulärer Kalziumionen zuständig. Im Fall von Dystrophin vermittelt es die kalziumabhängige Bindung an Calmodulin. Im Carboxyterminus befindet sich die genetische Sequenz für die Coiled-Coils-(CC)-Domäne. Sie führt zur Ausbildung der sogenannten coiled-coiled-strukturierten Regionen des Proteins und stellt die Bindungsstelle für Dystrobrevin dar. Des Weiteren wird durch die CC-Domäne möglicherweise das Zusammenspiel von Synaptobrevin und anderen Dystrophin-assoziierten Proteinen reguliert (Blake et al. 2002).

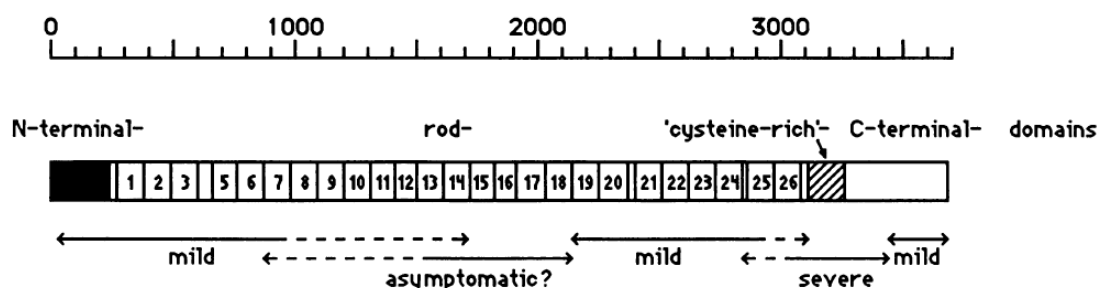


Abb. 1: Funktionelle Karte des Dystrophin-Gens (aus Koenig et al. 1989)

Je nachdem, in welchem Bereich des Gens eine Mutation auftritt, kommt es entweder zu einem milden, schweren oder asymptomatischen Krankheitsverlauf.

2.1.2. Dystrophin-Protein

Das Protein hat eine Masse von 427 Kilodalton (kDa). Aufgrund seines Aktin-bindenden Aminoterminus und den vielen Wiederholungseinheiten der zentralen Stabdomäne zählt es zur Familie der β -Spektrin/ α -Akinin Proteine (Koenig et al. 1989). Dystrophin ist zentraler Bestandteil des Dystrophin-assoziierten Proteinkomplexes (DAPC), dessen Untereinheiten teilweise innerhalb des Sarkolemm, teilweise in der Membran und zum Teil direkt außen auf

dem Sarkolemm lokalisiert sind. Der DAPC ist an der Membranstabilität und Signaltransduktion bei Muskelkontraktionen beteiligt (Wilson et al. 2017). Der Aminoterminus des Dystrophins reguliert die Interaktion mit dem zytoplasmatischen Aktin. Der Carboxyterminus am anderen Ende interagiert mit den restlichen Teilen des DAPC. Die Proteine dieses Transmembrankomplexes stellen die Verbindung zwischen Dystrophin mit der extrazellulären Matrix, zu der unter anderem Laminin und Fibronectin gehören, dar (Carlson 1998). Der DAPC besteht aus zehn verschiedenen Proteinen und kann in drei Subkomplexe unterteilt werden. Die drei werden als Dystroglykankomplex, Sarcoglykankomplex und zytoplasmatischer Komplex bezeichnet (Abb. 2) (Blake et al. 2002). Der aus α - und β -Dystroglykan bestehende Dystroglykankomplex befindet sich zum Teil im Sarkolemm und zum Teil außerhalb der Zelle. Der zytoplasmatische Carboxyterminus des β -Dystroglykans bindet im Normalfall an Dystrophin. Wenn die Bindung zu Dystrophin nicht stattfindet, kann das Carboxyende auch an das growth factor receptor-bound protein 2 (Grb 2), dessen Funktion noch nicht geklärt ist, binden. Grb 2 steht jedoch im Gegensatz zu Caveolin 3, einem Transmembranprotein für Signalmoleküle, nicht in Konkurrenz mit Dystrophin um die Bindungsstelle an β -Dystroglykan. Aus diesem Grund kann auch eine Überexpression von Caveolin 3 zur Dystrophie führen. Der zweite Bestandteil des Dystroglykankomplexes ist das α -Dystroglykan. Es bindet kalziumabhängig an Proteine der extrazellulären Matrix. Eine weitere Funktion von α -Dystroglykan ist die Interaktion mit dem Glykoprotein Agrin an den neuromuskulären Verbindungen, wodurch über weitere Zwischenschritte die Verteilung der Acetylcholinrezeptoren festgelegt wird (Blake et al. 2002).

Der zweite Komplex des DAPC ist der Sarcoglykankomplex. Er liegt im Sarkolemm und besteht aus α -, β -, γ - und δ -Sarcoglykan und dem Protein Sarcospan. Dabei kommt das α -Sarcospan nur im Skelett- und im Herzmuskel vor, im glatten Muskel wird es durch ε -Sarcospan ersetzt. Wie genau der Sarcospankomplex mit den anderen Komponenten des DAPC interagiert, ist noch nicht geklärt. Vermutet wird eine Verbindung zwischen δ -Sarcoglykan und β -Dystroglykan. Auch die Funktion des Komplexes konnte bisher nicht genau eingeordnet werden, wahrscheinlich spielt er eine Rolle in der Signaltransduktion (Blake et al. 2002).

Der zytoplasmatische Komplex enthält zum einen das Dystrophin als Verbindung zwischen Aktin und den anderen Proteinen und zum anderen die Syntropine. Sie binden direkt an Dystrophin und Dystrobrevin und verbinden so unterschiedliche Membranproteine im Muskel und Gehirn mit dem DAPC. Dies geschieht meistens über die Interaktion der sogenannten PDZ-Domäne des Syntropins mit dem Carboxyterminus der Membranproteine. Auch eine Verbindung mit der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) ist möglich. Das ist zu beachten, da bei DMD und BMD oft verminderte Mengen an nNOS am Sarkolemm festgestellt werden. Der letzte Bestandteil des zytoplasmatischen Komplexes ist das Dystrobrevin. Es bindet direkt an Dystrophin und rekrutiert dadurch Syntropinproteine an die Membran und spielt auch eine Rolle in der Signaltransduktion. Des Weiteren trägt es zur Regulation der Verteilung von Acetylcholinrezeptoren an den neuromuskulären Übergängen bei und verbindet Intermediärfilamente des Zytoskeletts mit dem DAPC (Blake et al. 2002). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass der DAPC eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von der extrazellulären Matrix ins Zytoplasma und umgekehrt hat, die Verteilung der Acetylcholinrezeptoren an neuromuskulären Übergängen reguliert und die Membranstabilität gewährleistet. Durch Mutationen, die zum Fehlen oder zur Dysfunktion von Komponenten dieses Komplexes führen, ist die Funktionalität des DAPCs gestört (Blake et al. 2002).

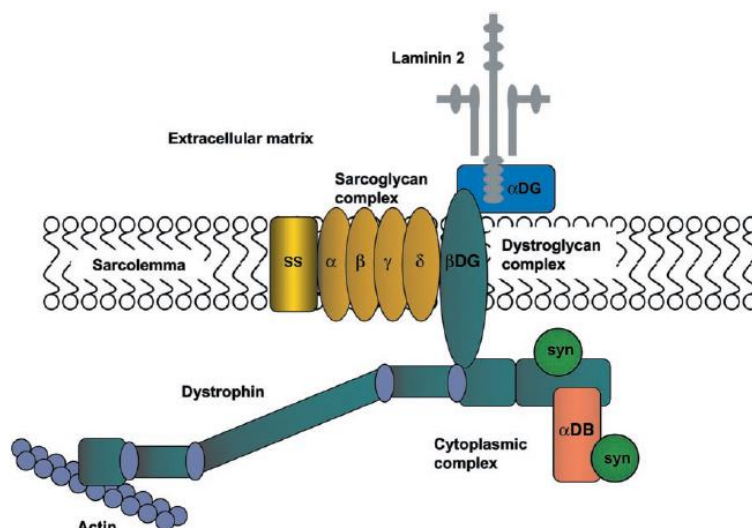


Abb. 2: Aufbau des DAPC: α DG= α -Dystroglykan; β DG= β -Dystroglykan; SS= Sarcospan; syn= Syntropin; α DB= α -Dystrobrevin (aus Blake et al. 2002)

2.1.3. Utrophin

Utrophin weist in der genetischen Sequenzierung eine 80%ige Homologie zu Dystrophin auf. Es ist ein Protein mit einer Masse von 395 kDa und kommt ebenfalls in der glatten Muskulatur, der Skelettmuskulatur und in der Herzmuskulatur vor. Zu Beginn des Wachstums tritt Utrophin im Sarkolemm auf und wird fortschreitend durch das Dystrophin ersetzt, sodass es bei ausgewachsenen Lebewesen nur noch im Bereich der neuromuskulären und myotendinösen Übergänge vorkommt. Die starke strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit führt zu der Vermutung, dass Utrophin in der Lage ist, bei dystrophischen Muskeln die Stelle von Dystrophin wieder einzunehmen und damit die Funktion des erkrankten Muskels zu verbessern (Wilson et al. 2017). Zu dieser Hypothese wurde von Kawajiri et al. 1996 eine Studie anhand von Muskelbiopsaten, welche von menschlichen BMD- und DMD-Patienten und gesunden Menschen gewonnen wurden, durchgeführt. Mittels Immunblot-Analysen und immunhistochemischen Verfahren wurde die Expression von Dystrophin, Utrophin und anderen Proteinen des DAPC sowie ihre Lokalisation auf dem Sarkolemm quantifiziert. Im gesunden Muskel zeigte sich ein starkes Auftreten von Dystrophin und β -Dystroglykan während Utrophin nur im Bereich der neuromuskulären Verbindungen vorkam. In den dystrophischen Muskeln konnten folgende Expressionsmuster beobachtet werden:

DMD:

1. Keine Expression von Dystrophin, schwache Expression von β -Dystroglykan, keine Expression von Utrophin
2. Alle drei nicht exprimiert

BMD:

1. Starke Expression von Dystrophin und β -Dystroglykan, schwache Expression von Utrophin
2. Moderate Expression von Dystrophin, moderate bis starke Expression von β -Dystroglykan und schwache bis moderate Expression von Utrophin
3. Schwache Expression von Dystrophin, schwach bis starke Expression von β -Dystroglykan und schwach bis starke Expression von Utrophin
4. Alle drei nicht exprimiert

Diese Muster zeigen, dass Utrophin zur Kompensation des fehlenden Dystrophins an das dystrophin-assoziierte Protein β -Dystroglykan binden kann. Reguliert wird das vermutlich

durch ein Ereignis nach der Transkription. Die Bindung zwischen Utrophin und β -Dystroglykan kommt durch die starke Ähnlichkeit des Carboxyterminus der beiden Proteine zustande. Zusätzlich wird durch das Muster die Vermutung aufgestellt, dass die Bindung zwischen Dystrophin und β -Dystroglykan stärker als die Bindung zwischen Utrophin und β -Dystroglykan ist, da bei einer starken Expression von β -Dystroglykan auch Dystrophin vermehrt auftritt, im Muskel von BMD-Patienten kommt es jedoch bei einer starken β -Dystroglykanexpression nur zu einem schwachen Auftreten von Utrophin. Beim Fehlen von β -Dystroglykan können beide nicht binden. In der anschließenden Abbildung ist die Korrelation zwischen Dystrophin und Utrophin bei BMD-Patienten dargestellt (Abb. 3). Bei einer Reduktion von Dystrophin auf 15–25 % erreicht Utrophin seine maximale Präsenz am Sarkolemm (Kawanri et al. 1996).

Diesen Ergebnissen widerspricht aber die Studie, die 2014 von Hollinger et. al. veröffentlicht wurde. Hier wurden bestimmte Muskelgruppen von an BMD erkrankten Schweinen im Vergleich zu gesunden Schweinen untersucht. Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass sowohl die Genexpression als auch die Proteinexpression von Utrophin im gesunden und kranken Muskel gleich sind. Anders als vorher beim Menschen beschrieben, konnte hier also eine Kompensation des Dystrophins durch Utrophin nicht nachgewiesen werden (Hollinger et al. 2014).

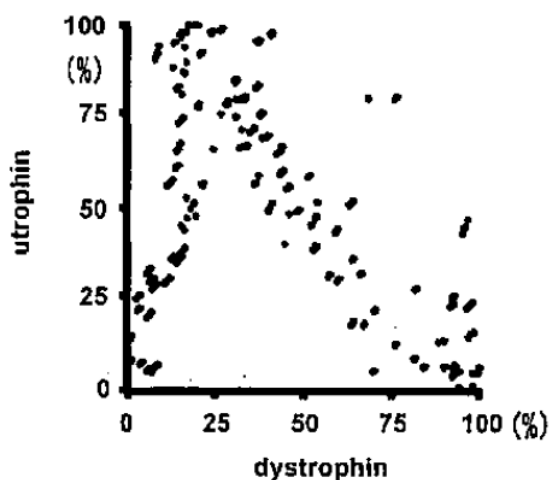


Abb. 3: Auftreten von Dystrophin und Utrophin im Muskel von BMD-Patienten (aus Kawanri et al. 1996)

2.2. Molekulare Grundlagen der Muskeldystrophie

2.2.1. Mutationen im Dystrophin-Gen

Die Erkrankungen DMD und BMD entstehen durch Mutationen am Dystrophin-Gen. In zwei Drittel der Fälle sind diese erblich bedingt und bei einem Drittel entstehen sie spontan. Ursächlich sind zu zwei Dritteln größere Schäden oder Duplikationen und zu ungefähr einem Drittel Punktmutationen oder kleinere Schäden bzw. Duplikationen (Wilson et al. 2017).

Durch die Lokalisation des Gens auf dem X-Chromosom tritt die Krankheit vorwiegend bei männlichen Lebewesen klinisch in Erscheinung. Bei den weiblichen Trägerinnen wird das betroffene X-Chromosom inaktiviert und nur das andere kommt zur Ausprägung. Die Vererbung der Mutation erfolgt also gonosomal rezessiv (Osmose 2016).

Durch die Veränderungen am Dystrophin-Gen kommt es bei DMD zu stark verkürzten und instabilen Dystrophin-Proteinen und somit zu einem schwerwiegenderem Krankheitsbild. Bei der BMD hingegen werden beschädigte, aber teilweise funktionelle Proteine produziert und daher verläuft die Krankheit langsamer und milder (Koenig et al. 1989). Im folgenden Abschnitt wird die Leserahmen-Theorie, welche die Entstehung der verschiedenen Krankheitsbilder erklärt, genauer ausgeführt und der Zusammenhang zwischen der Lokalisation und Art der genetischen Veränderung mit der phänotypischen Ausprägung erläutert.

2.2.2. Leserahmen-Theorie

Bei der DMD führen die Mutationen zu einer Verschiebung des translationellen Leserahmens. Dadurch werden Stop-Codons zu früh produziert, was dazu führt, dass der Aminoterminus des Proteins synthetisiert werden kann, der Carboxyterminus aber nicht. Das resultierende Dystrophin ist daher stark verkürzt und nicht funktionell. Bei der BMD bleibt der Leserahmen erhalten und so kommt es zur Produktion eines kleineren, aber partiell funktionellen Proteins (Wright et al. 1993). Bei ungefähr 92 % der Krankheitsfälle im Menschen stimmt diese Theorie mit den Untersuchungen überein. Die meisten gefundenen Ausnahmen sind im Bereich des 5'-Endes zwischen Exon drei und sieben zu finden (Beggs et al. 1991). Auch in einer anderen Studie wurde der größte Teil der Ausnahmen in diesem Bereich gefunden.

Gründe für Abweichungen von der Leserahmen-Theorie können Mutationen sein, die zu groß sind, egal ob sie den Leserahmen unterbrechen oder nicht, und deswegen immer zu einem nicht funktionellen Protein führen oder sie entstehen durch Grenzen der immunhistochemischen Methoden oder Studienverläufe (Koenig et al. 1989). Des Weiteren muss beachtet werden, dass Patienten mit den gleichen genetischen Veränderungen und daraus resultierenden Proteinveränderungen unterschiedliche klinische Verläufe haben können. Aus diesem Grund wird angenommen, dass auch epigenetische Faktoren und die Umgebung eine Rolle bei der Krankheitsausprägung spielen (Beggs et al. 1991).

2.2.3. Zusammenhang zwischen Genotyp und Krankheitsausprägung

Wenn man den genetischen Schaden und den daraus resultierenden Schweregrad der Erkrankung betrachtet, kann man Zusammenhänge feststellen, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird. Durch Mutationen im genetischen Code des Aminoterminus entstehen Schäden der Region des Dystrophins, welche an das zytoplasmatische Aktin bindet. Aus diesem Grund kommt es zu einer Instabilität des Proteins und damit zu DMD und schwereren Krankheitsverläufen (Beggs et al. 1991). Ist das erste Exon von einer Mutation betroffen, ist der Grund für die Entstehung von DMD das Fehlen des Promotors oder der Initiationsstelle für die Translation, wodurch eine Proteinsynthese verhindert wird (Koenig et al. 1989).

Die zentrale Stabdomäne hingegen ist verantwortlich für die Größe des Dystrophins und weniger für seine Funktion. Schäden in dieser Region führen deswegen zum milderen Krankheitsbild einer BMD. Jedoch kommt es darauf an, in welcher Region der Domäne der Schaden liegt. Ist die Mutation im proximalen Teil, entstehen Krämpfe, beim Verlust der Mitte kommt es nur zur Erhöhung des Creatinkinase-(CK)-Wertes ohne klinische Symptome und bei Mutationen in den anderen Regionen entsteht eine klassische BMD. Die cysteinreiche Region und der Carboxyterminus sind wiederum essentiell für die Funktion des Dystrophins und daher verursachen auch kleine genetische Veränderungen dort die schwerwiegendere DMD (Beggs et al. 1991). Beispielsweise werden bei Schäden am Exon 54, 55 oder 58 nur die ersten drei Viertel des Dystrophinproteins synthetisiert. Da dabei die cysteinreiche Region und der Carboxyterminus fehlen, ist das Protein nicht funktionsfähig. Fehlen jedoch der Aminoterminus und die zentrale Stabdomäne sind die Auswirkungen nicht so schwerwiegend

und es kommt zur BMD (Koenig et al. 1989). Eine Ausnahme ist die terminale Region des Carboxyterminus. Bei Schäden in dieser Region entsteht nur eine BMD (Beggs et al. 1991).

Allgemein lässt sich sagen, dass Veränderungen der Menge an Dystrophin meist durch Mutationen verursacht werden, die den Promotor oder die Stabilität der mRNA und des Proteins beeinflussen, Veränderungen der Größe wiederum haben meistens Mutationen als Ursache, die den Splicing-Prozess der mRNA beeinflussen (Beggs et al. 1991).

Aufgrund seiner Größe ist das Intron zwischen Exon 44 und 45 am häufigsten von Mutationen betroffen. 90 % aller Schäden können auf neun Exons lokalisiert werden. Diese sind die Exons drei, acht, 13, 43, 44, 47, 50, 51 und 52 (Koenig et al. 1989).

Jedoch treffen die beschriebenen Korrelationen nicht auf alle Fälle der Muskeldystrophien zu. Gründe dafür sind möglicherweise alternative Splicing-Prozesse. Außerdem muss beachtet werden, dass viele Mutationen innerhalb des Leserahmens, insbesondere zwischen Exon 31 und 44, nicht zu klinischen Symptomen führen und deswegen die Häufigkeit unterschätzt wird (Koenig et al. 1989).

In seltenen Fällen sind auch Duplikationen die Ursache von DMD und BMD. In der Studie von Xiuyuan Hu et al. traf das auf drei von 120 an Muskeldystrophie erkrankten Patienten zu. In den meisten veröffentlichten Studien ist die Häufigkeit von Duplikationen viel geringer als die von anderen Mutationsformen. Ein Grund dafür könnte sein, dass Deletionen mit den gängigen molekularbiologischen Nachweisverfahren viel besser entdeckt werden können als die Duplikationen. Duplikationen entstehen entweder durch ungleiche, aber homologe oder durch nicht homologe Cross-Over-Ereignisse. Der Austausch von genetischen Sequenzen führt dazu, dass auf einer Seite Abschnitte fehlen und auf der anderen Seite doppelte Abschnitte vorkommen. Ohne selektive Vorgänge würde man also genau so viele Deletionen wie Duplikationen erwarten. Da es aber eine viel höhere Rate an Deletionen gibt, wird angenommen, dass bisher unbekannte Mechanismen zur Deletion ohne Duplikationen führen können und dass daher nicht alle Deletionen durch Cross-Over-Ereignisse entstehen. Bei den drei in der genannten Studie untersuchten Duplikationen kam es jeweils zur Verdopplung eines Exons und dadurch zu sehr unterschiedlichen Krankheitsbildern. Der Grund dafür sind wieder die verschiedenen funktionellen Bereiche des Gens und die Abhängigkeit davon, ob der Leserahmen unterbrochen wird oder nicht (Hu et al. 1988).

2.3. Pathogenese

Durch den partiellen oder kompletten Verlust des Proteins Dystrophin wird die Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der Zellmembran unterbrochen. Über verschiedene Mechanismen, welche im Folgenden genauer erklärt werden, kommt es unter anderen zum proteolytischen Abbau von Muskelgewebe, zur Faserdegeneration und -regeneration und zu Fettvakatwucherungen (Ohlendieck und Swandulla 2017).

Zur Erklärung der Pathogenese der Muskeldystrophien wurde früher die sogenannte Strukturhypothese herangezogen. Diese besagt, dass periodische Membranrupturen im Muskel, die während der Kontraktion entstehen, zum Verlust von Muskelenzymen und zur veränderten Interaktion mit der extrazellulären Flüssigkeit führen. Durch die daraus folgenden veränderten intrazellulären Ionenkonzentrationen kommt es zum Zelltod. Jedoch wurde in nachfolgenden Versuchen an Mäusen festgestellt, dass dystrophische Zellmembranen eine höhere Elastizität haben als gesunde Zellmembranen und daher nicht schneller rupturieren können. Außerdem wirkt sich viel Bewegung nicht negativ auf den Krankheitsverlauf aus. Aus diesen Gründen schien die Hypothese nicht der Wahrheit zu entsprechen und eine neue Hypothese wurde aufgestellt. In den Experimenten von Carlson et al. 1996 wurde beobachtet, dass es eine pathophysiologische Verbindung zwischen dem Fehlen von Dystrophin und einer Kalzium-Leck-Aktivität gibt. Dies kommt durch eine veränderte Interaktion zwischen den Acetylcholinrezeptoren und dem dystrophischen Zytoskelett und durch intrazelluläre Signaltransduktionsenzyme zustande, welche die Verbindung zwischen den Rezeptoren und dem Zytoskelett koordinieren. Die neue Hypothese besagt also, dass die Aktivität der Acetylcholinrezeptoren durch die zytoskelettalen Veränderungen, welche aufgrund des Fehlens von Dystrophin auftreten, beeinträchtigt ist und es dadurch zu einem erhöhten Kalzium-Einstrom in die Muskelzellen kommt. Der DACP ist durch den Verlust von Dystrophin nicht funktionsfähig und damit ist auch die zytoskelettale Struktur nicht stabil. Die 43 kDa Proteine, welche die Liganden für die Acetylcholinrezeptoren sind, binden aufgrund dieser Membraninstabilität exzentrisch an ihre Bindungsstellen. Die abnorme Bindung versetzt die Acetylcholinrezeptoren in einen Zustand, in dem sie für ihre Agonisten nicht ansprechbar sind und erhöhen dadurch den Kalziumeinstrom (Abb. 4) (Carlson 1998). Die erhöhte Kalziumkonzentration nahe der Zellmembran aktiviert die Protease Calpain, wodurch es zur Proteolyse von zytoskelettalen und ihren assoziierten Proteinen kommt.

Daraus folgen posttranslationale Änderungen dieser Bestandteile, was zu weiteren zytoskelettalen Abweichungen führt. Zusätzlich wird durch den erhöhten Kalziumspiegel auch das Protein Gelsolin aktiviert. Dieses löst die Auftrennung von Aktinfilamenten aus und trägt somit auch zu Schäden am Zytoskelett und Läsionen in der Membran bei. Auch andere second-messenger werden aktiviert und setzen den Kreislauf über eine weitere Steigerung des intrazellulären Kalziumgehaltes fort. Nicht nur die Calpaine nahe der Zellmembran, sondern auch die intrazellulären Calpaine werden beim Fortschreiten des Prozesses aktiviert und bewirken eine myofibrilläre Desorganisation und Muskelnekrosen (Carlson 1998).

Die aus dem Gleichgewicht gekommene Kalziumhomöostase löst auch Schäden an den Mitochondrien aus, wodurch Superoxide und freie Radikale frei werden. Als Folge kommt es zum Untergang von Muskelfasern, Verlust an Zellkernen, Entzündungsreaktionen und schließlich zur Apoptose (Selsby et al. 2015).

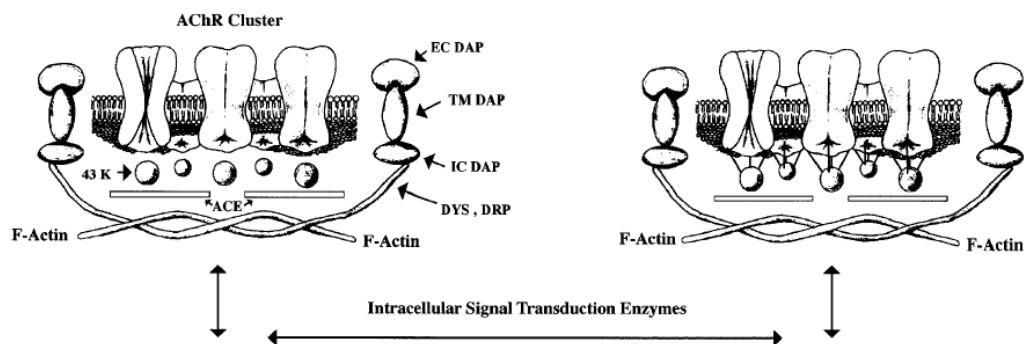
In neueren Studien wurde die Hypothese des Kalziumeinstroms aufgrund der Fehlregulation von Acetylcholinrezeptoren noch erweitert. Bei Versuchen mit Mäusen konnte herausgefunden werden, dass eine uneingeschränkte körperliche Aktivität und damit viele Muskelkontraktionen schon nach drei bis vier Wochen zu histologischen Abweichungen wie Myonekrosen und Faserveränderungen bei über der Hälfte der untersuchten Muskelfasern führen. Muskeln, die fixiert waren und damit keiner Kontraktion ausgesetzt wurden, wiesen nach der gleichen Zeit keine histologischen Veränderungen auf. Auch ein Versuch mit kultivierten Myotuben bestätigte das, da der intrazelluläre Kalziumgehalt bei spontan kontrahierenden Muskeln höher war als in Muskeln, welche durch Tetrodotoxin immobilisiert waren. Der Muskelschaden wird demnach durch ein Zusammenspiel aus Dystrophinmangel, Kalziumeinstrom und Muskelkontraktion verursacht (Wilson et al. 2017).

Möglicherweise spielt auch die nNOS eine Rolle in der Pathogenese der Muskeldystrophie. Die nNOS ist ein Signaltransduktionsprotein, welches in Verbindung mit dem DAPC steht und die Gefäßdurchblutung, die Kalziummobilisation, den Glukosemetabolismus und die Kontraktion mitreguliert. Bei Fehlfunktionen des DAPC sinkt das Level von Stickstoffmonoxid und dadurch kommt es einerseits zur Beeinträchtigung der Durchblutung und andererseits auch zu einer gesteigerten Aktivität der Nikotinamidadenindinukleotidphosphat-(NADPH)-Oxidase. Diese produziert dann freie Sauerstoffradikale, die die Muskel- und Fettoxidation verstärken. Neben der Aktivierung über

das Absinken von Stickstoffmonoxid kann die NADPH-Oxidase auch über Dehnungsrezeptoren in der Zellmembran aktiviert werden (Wilson et al. 2017).

Die auf die Muskeldegeneration folgende Fettinvasion verstärkt sich mit dem Fortschreiten der Erkrankung zunehmend. Auch bei erkrankten Menschen, die noch keine muskulären Beschwerden aufweisen, können zum Teil schon beginnende fettige Infiltrationen gefunden werden (Wokke et al. 2014).

A. Dystrophin Present



B. Dystrophin Absent

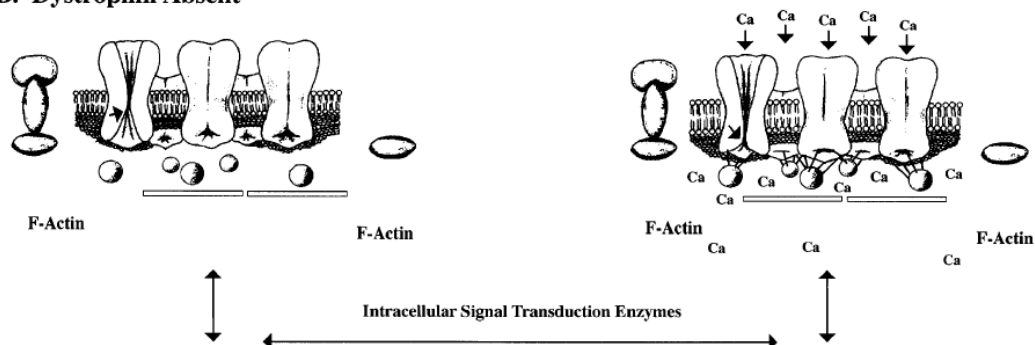


Abb. 4: Zytoskelettale Veränderungen führen zu einem Kalziumeinstrom über die Fehlregulation von Acetylcholinrezeptoren. TM DAP= transmembranöse Anteile des DAPC; IC DAP= intrazelluläre Anteile des DAPC; DYS= Dystrophin; DRP= Dystrophin-bezogene Proteine; $\leftrightarrow$ ACE $\leftrightarrow$ = zytoskelettale Elemente; AChR= Acetylcholinrezeptor; 43 K= 43 kDa-Protein (aus Carlson 1998).

2.4. Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie in der Human- und Veterinärmedizin

2.4.1. Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie in der Humanmedizin

Sowohl die DMD als auch die BMD sind bisher vor allem aus dem Bereich der Humanmedizin bekannt. Der Unterschied zwischen den beiden Krankheitsbildern liegt im Schweregrad des Krankheitsverlaufs (Blake et al. 2002).

Erste Symptome der DMD treten zwischen dem zweiten und fünften Lebensjahr auf, bei der Geburt zeigen die Betroffenen bis auf einen erhöhten CK-Wert im Serum keine Symptome. Zunächst werden ein wackliges Gangbild, Schwierigkeiten beim Treppensteigen und Verzögerungen beim Erlernen von Laufen oder Rennen beobachtet. Später kommt es dann zur Pseudohypertrophie der Wadenmuskulatur, zur Schwäche in den proximalen Gliedmaßen und zur Ausprägung der sogenannten Gowers-Zeichen, bei dem die Kinder die Arme benutzen, um von einer liegenden Position in eine stehende zu gelangen. Meistens sind die Betroffenen ab einem Alter von zwölf Jahren auf einen Rollstuhl angewiesen. Im Endstadium der Krankheit kommt es dann zur Schwäche in den Armen, zur Kyphose und, durch Schäden an der Interkostal- oder Herzmuskulatur, zum Tod mit Anfang 20. Bei der BMD ist der Verlauf wie bei der DMD, jedoch beginnen die Symptome erst später und sind milder ausgeprägt, wodurch die Lebenserwartung viel höher ist (Blake et al. 2002). Deshalb sind die Patienten bei BMD oft noch bis ins hohe Alter gehfähig. Zusätzlich treten bei der BMD auch gelegentlich untypische Symptome, wie Muskelkrämpfe oder Kardiomyopathien ohne sonstige Muskelschwäche auf (Beggs et al. 1991). Durch diese unspezifische Symptomatik werden viele Fälle von BMD nicht erkannt und fehldiagnostiziert (Bushby et al. 1991). Sowohl bei der DMD als auch bei der BMD kann eine leichte kognitive Beeinträchtigung festgestellt werden (Blake et al. 2002).

Um die beiden Erkrankungen zu diagnostizieren, muss aufgrund des genetischen Ursprungs immer die Krankheitsgeschichte der Familie mit einbezogen werden. Hinweise auf eine DMD sind eine beeinträchtigte Muskelfunktion bei einem männlichen Kind, ein erhöhter CK-Wert oder die Erhöhung von Transaminasen ohne zugrundeliegenden Leberschaden. Zur Bestätigung des Verdachts werden vor allem genetische Tests durchgeführt. Beispiele dafür

sind Multiplex-PCR-Verfahren, welche nur Schäden und nur Teile des Gens erfassen, und die multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), welche Schäden und Duplikationen im gesamten Gen erkennt. Es kann auch zusätzlich eine Muskelbiopsie durchgeführt werden, die dann mit immunhistochemischen Methoden weiter untersucht wird (Bushby et al. 2010).

Zur Therapie der DMD gibt es in den USA bereits zwei zugelassene Therapeutika. Ein Produkt beruht auf der Hemmung der Entzündungsreaktion durch Glukokortikoide (Produktname Emflaza TM, Wirkstoff Deflezacort, Hersteller: Sanofi Aventis, United Kingdom). Durch diese wird die Muskelkraft erhöht, die Patienten sind erst später auf einen Rollstuhl angewiesen, die Lungenfunktion wird verbessert und Skoliosen treten seltener auf. Der Nachteil dieser Behandlung ist, dass der Verlauf der Krankheit nur verlangsamt wird und viele Nebenwirkungen wie Frakturen, Katarakt und Gewichtszunahme, was die Belastung der Muskulatur wiederum erhöht, auftreten. Das zweite Medikament ist Eteplirsen (Produktname: Exondys 51 TM, Hersteller: Sarepta Therapeutics Inc., USA). Es führt zum Überspringen des Exons 51 bei der Translation und damit zur Produktion eines vollständigen Proteins. Eine ähnliche Wirkungsweise hat Ataluren (Produktname: Translarna TM, Hersteller: PTC Therapeutics, USA), welches dazu führt, dass entstandene Stopcodons übersprungen werden. Möglichkeiten für weitere Therapieansätze werden in der Transplantation von Myoblasten oder Stammzellen gesehen oder auch in Exon-Skipping-Medikamenten, Utrophinmodulatoren oder Kalziummodulatoren (Wilson et al. 2017).

Je nach Fortschritt der Krankheit und betroffener Organsysteme können ergänzend auch symptomatische Therapien eingesetzt werden. Dazu gehören unter anderem Sehnenoperationen, Wirbelsäulenversteifung, Angiotensin converting Enzym-(ACE)-Hemmer, β -Blocker, künstliche Beatmung oder Physiotherapie (Bushby et al. 2010).

Damit der Erfolg der Therapien eingeschätzt werden kann, wurden verschiedene Tests und diagnostische Mittel entwickelt. Zum Beispiel gibt es den Sechs-Minuten-Geh-Test. Hierbei wird die Funktion der Skelettmuskulatur und auch die des Herzens und Respirationstraktes überprüft. Der Patient geht sechs Minuten lang auf einem ebenen Boden, wobei die Strecke, die er pro Minute zurücklegt, sowie die Stürze aufgezeichnet werden. Der Nachteil dieser Methode ist die schwere Interpretation bei sehr jungen Patienten, weil die Gehfähigkeit mit der Entwicklung von Kleinkindern zunimmt, mit dem Krankheitsfortschritt aber dann wieder

abnimmt. Ein ähnliches Prinzip haben die Messung der Zeit, in der zehn Meter gelaufen werden, oder vier Treppenstufen bestiegen werden. Andere Möglichkeiten sind die Messung von Muskelenzymen im Blut, die Überwachung der Vitalparameter oder bildgebende Verfahren wie Magnetresonanztomographie oder Magnetresonanzspektroskopie zur Einschätzung der Fettinfiltration und Entzündungsreaktion. Das Verfahren mit der höchsten Sensitivität ist jedoch die Messung des Dystrophins in Muskelbiopsaten mit Hilfe der Western-Blot-Analysen, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), oder immunhistochemischen Verfahren (Wilson et al. 2017).

2.4.2. Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie in der Veterinärmedizin

2.4.2.1. Tiermodelle

Um die DMD und BMD beim Menschen weiter zu erforschen und Therapien zu entwickeln, wurden schon mehrere Tierarten, wie zum Beispiel Mäuse oder Golden Retriever, als Modelle eingesetzt (Selsby et al. 2015).

Mäuse sind die meist genutzten Modelltiere für die Erforschung der humanen DMD. Durch eine Punktmutation im Exon 32 wird bei ihnen ein Stopcodon ausgelöst und dadurch ein verkürztes Protein produziert. Die DMD bei der Maus ist sehr gut untersucht, hat besonders viel zum Verständnis der Pathogenese beigetragen und war auch bei der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten hilfreich. Ein bedeutender Nachteil dieses Modells ist jedoch, dass die Krankheitsausprägung deutlich schwächer ausfällt als beim Menschen. Ursächlich dafür ist die geringere Körpergröße und die schnellere Regenerationsfähigkeit der Muskeln durch eine höhere Expression von Utrophin. Auch die Übertragungen von Therapieansätzen und Dosierungen von Medikamenten von der Maus auf den Menschen sind oft sehr schwierig (Selsby et al. 2015).

Beim Golden Retriever führt eine Mutation am 3'-Ende des sechsten Introns zu einer Unterbrechung des Leserahmens. Das resultierende Krankheitsbild ähnelt im Schweregrad und den klinischen Erscheinungen stark der menschlichen DMD. Jedoch tritt beim Golden Retriever eine hohe Variabilität der Schwere der Krankheit durch eine hohe Rate an

alternativen Splicingmechanismen auf. Diese Variabilität macht die Interpretation von Daten schwierig. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Therapie mit Kortikosteroiden, welche beim Menschen zu großen Erfolgen in der Verbesserung der Muskelfunktion führt, beim Hund die Muskelfunktion durch Kalzifizierung der nekrotischen Fasern verschlechtert (Selsby et al. 2015).

Um weitere Fortschritte bei der Untersuchung des Krankheitsbildes und in der Entwicklung von Therapiemöglichkeiten zu machen, wurde auch das Schwein als Tiermodell genutzt. Ein großer Vorteil ist, dass das Genom des Schweines dem menschlichen sehr ähnlich ist, außerdem sind die Körpergrößen von Schwein und Mensch vergleichbar. Noch dazu kommt, dass die Übertragung von Therapien auf den Menschen, durch die ähnliche Körperzusammensetzung und vergleichbare metabolische Vorgänge, viel einfacher ist als bei Mäusen oder Hunden. Da bei der humanen DMD der Tod häufig durch Schäden am Myokard eintritt, ist auch die Ähnlichkeit des kardiovaskulären Systems zwischen Schwein und Mensch ein großer Vorteil. Aus diesen Gründen wurden bereits mehrere Schweine-Modelle untersucht und beschrieben. Ein Beispiel dafür ist die Entwicklung eines Minipig-Modells für die BMD. Dabei wurde das Genom so modifiziert, dass eine Mutation an der zentralen Stabdomäne, welche den Leserahmen nicht unterbrach, entstanden ist. Die erkrankten Schweine entwickelten sich die ersten zwei Lebensmonate normal, die Symptome einer BMD traten innerhalb des ersten Lebensjahres auf. Dieses Modell kann in Zukunft zur Entwicklung von Medikamenten, die zum Überspringen eines Exons führen, eingesetzt werden (Selsby et al. 2015).

Ein anderes Modell wurde von Klymiuk et al. entwickelt. Durch gezielte Genmodifikation und Zellkerntransfer entstanden Schweine mit einem beschädigten Exon 52 und damit einer Krankheitsausprägung, die der DMD beim Menschen entspricht. Histologisch waren die klassischen Anzeichen, wie Variationen im Faserdurchmesser, zentrale Kerne und Fibrosen zu sehen. Besonders schwer betroffen waren das Diaphragma, die Laryngealmuskulatur, die Interkostalmuskulatur und der *Musculus triceps brachii*. Die Bewegungseinschränkungen der Schweine glich denen der an DMD erkrankten Menschen. Ein großer Unterschied zum Menschen ist aber der schnelle Tod nach drei Lebensmonaten durch respiratorische Beeinträchtigungen. Bis zu diesem Punkt entspricht der Krankheitsablauf dem beim Menschen, nur läuft er viel schneller ab. Da die Muskelkontraktion eine Rolle in der

Pathogenese spielt, geschieht das vermutlich durch die schnellere Körpermassenzunahme und die frühere eigenständige Bewegung von Ferkeln im Vergleich zu neugeborenen Menschen. Auch das Wachstum der Ferkel während und nach der Trächtigkeit ist viel ausgeprägter als beim Menschen und wirkt sich auch negativ auf den Krankheitsverlauf aus. Unterstützt wird diese Vermutung durch die negative Korrelation zwischen dem Geburtsgewicht und der Lebenserwartung der Ferkel. Durch die höhere Belastung der Muskulatur sterben die Schweine mit dem höchsten Gewicht am frühesten (Klymiuk et al. 2013).

2.4.2.2. Spontanes Auftreten beim Schwein

Wie in der Einleitung beschrieben, wurde bei der Schlachtkörperuntersuchung in Japan ein Fall von spontaner BMD beim Schwein beschrieben. Das betroffene Tier zeigte keine klinische Symptomatik bei der Lebendtieruntersuchung, jedoch war das Muskelfleisch blass und gelblich-rot verfärbt. Die Veränderungen betrafen den *Musculus rectus abdominis* und die Femuralmuskulatur, andere Muskelgruppen und Organe wiesen keine pathologischen Abweichungen auf. Um die Ursache genauer zu untersuchen, wurden histologische Präparate aus den erkrankten Muskeln hergestellt. Bei der Auswertung dieser stellte man eine Infiltration mit Fettgewebe mit einem Ausmaß von 50 % im betroffenen Muskelgewebe fest. Die verbleibenden Muskelfasern zeigten variierende Faserdurchmesser und vereinzelt vakuoläre Degeneration, Hyalinisierung, Myophagie, Nekrosen, zentral liegende Zellkerne, Faserspaltungen und Fibrosen im Endomysium und innerhalb des Fettgewebes (Abb. 5). Insgesamt entsprach der histologische Befund dem der humanen BMD. Da diese Muskeldystrophie X-chromosomal vererbt wird und damit häufiger bei männlichen Tieren vorkommt, wurde das Geschlecht des betroffenen Schweines durch eine PCR bestimmt. Diese ergab, dass das betroffene Tier männlich war. Als drittes diagnostisches Mittel wurde die Immunhistologie eingesetzt. Bei der Auswertung dieser fiel in den betroffenen Muskeln eine blasse und nur fokale Anfärbung des Dystrophins im Sarkolemm auf, bei Muskeln von nicht betroffenen Schweinen zeigte sich diese kontinuierlich und stark (Abb. 6). Zusammenfassend wurde eine erhebliche Übereinstimmung mit dem Krankheitsbild der humanen BMD festgestellt (Horiuchi et al. 2014).

Ein weiteres spontanes Auftreten von Muskeldystrophie beim Schwein wurde wenig später im United States Meat Animal Research Center erfasst. Es kam zum stressinduzierten Tod

zweier männlicher Schweine, obwohl die Population frei von der Mutation des Ryanodinrezeptors 1, welche als Auslöser für das porcine Stresssyndrom gilt, war. In weiteren Untersuchungen stellte man fest, dass alle erkrankten Schweine eine nonsynonyme Punktmutation im Dystrophin-Gen hatten, die zum Ersatz der Aminosäure Arginin durch Tryptophan im resultierenden Protein führte. Daraus folgte ein vermindertes Auftreten von Dystrophin im Sarkolemm, besonders ausgeprägt war das im Diaphragma und im *Musculus longissimus dorsi* (Selsby et al. 2015). Der *Musculus psoas major* hingegen war nicht betroffen. Auch histologisch ließen sich im Diaphragma und im *Musculus longissimus dorsi* nekrotische Läsionen, fettige Infiltrationen, Fibrosen und variierende Faserdurchmesser feststellen, der *Musculus psoas major* zeigte jedoch keine histopathologischen Auffälligkeiten. Ein möglicher Grund für diese Unterschiede kann einerseits der höhere Anteil an Proteinen des DAPCs im *Musculus psoas major* sein, andererseits auch die geringere Beanspruchung dieses Muskels bei der normalen Bewegung im Gegensatz zum Diaphragma und *Musculus longissimus dorsi*. Eine weitere mögliche Ursache ist, dass der *Musculus psoas major* einen höheren Anteil an Typ-1-Muskelfasern hat, welche generell als krankheitsresistenter gelten, während die anderen beiden Muskeln hauptsächlich Typ-2-Muskelfasern beinhalten (Hollinger et al. 2014).

Da die Auswirkungen der Dystrophinverminderung auf die Herzmuskulatur im Krankheitsbild beim Menschen eine wichtige Rolle spielen, wurde diese bei den betroffenen Schweinen auch genauer untersucht. Das Myokard der erkrankten Schweine war bis zum Alter von zwei Monaten gesund, im Alter von zwölf Monaten traten fokale Nekrosen und dadurch eine Beeinträchtigung der myokardialen Funktion auf. Diese Einschränkung der Herzfunktion war bei den betroffenen Schweinen wahrscheinlich auch einer der Gründe für den plötzlichen, durch Stress verursachten Tod (Selsby et al. 2015).

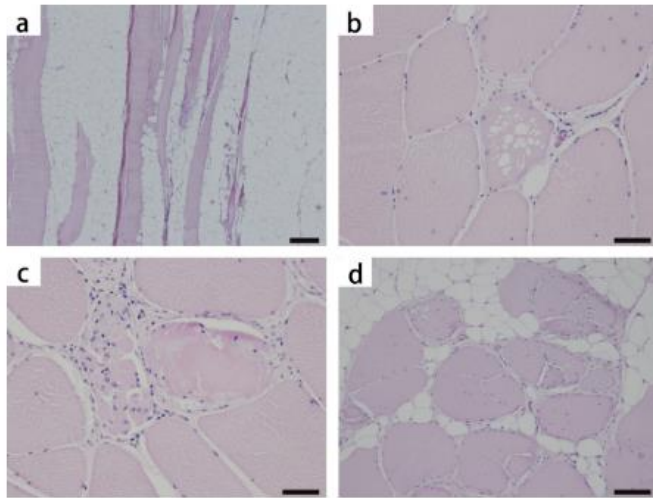


Abb. 5: Histologische Präparate des *Musculus rectus abdominis*; a: Infiltration des Muskelgewebes mit Fettgewebe; b: Vakuoläre Degeneration; c: Hyalinisierung und Myophagie; d: Faseraufspaltungen (aus Horiuchi et al. 2014)

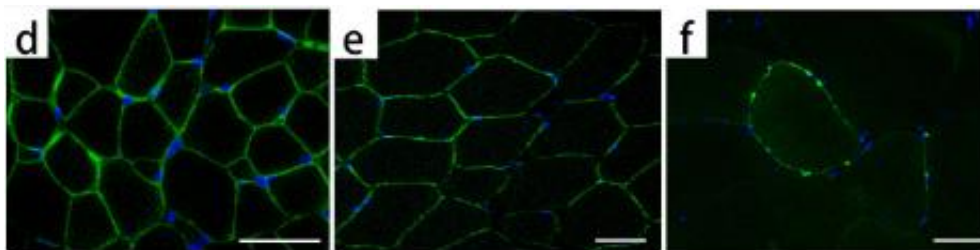


Abb. 6: Immunfluoreszenzfärbung des Dystrophins; d: Dystrophinfärbung im gesunden Muskel; e: Dystrophinfärbung in einem nekrotischen, nicht von Dystrophie betroffenen Muskel; f: Dystrophinfärbung im von BMD betroffenen Muskel (aus Horiuchi et al. 2014)

2.4.2.3. Zusammenhang mit dem porzinen Stresssyndrom

Die im vorherigen Kapitel erwähnten Schweine, welche an Symptomen des porzinen Stresssyndroms starben, obwohl bei ihnen keine Mutation am Ryanodinrezeptor zu finden war, hatten stattdessen eine Punktmutation am Dystrophin-Gen. Da schon öfter auffiel, dass Schweine, welche keine Ryanodin-Mutation haben, trotzdem empfindlich auf Halothannarkosen reagieren und anfälliger für Gehunfähigkeiten nach Stresssituationen sind, auch eine schlechtere Fleischqualität haben, wurde nach den genetischen Ursachen gesucht.

Dafür wurde die Paarung, aus der die beiden betroffenen Schweine stammten, mehrfach wiederholt. Von den 242 produzierten Nachkommen starben 18 während einer Halothannarkose und acht einige Tage später bei einem Transport. Die Symptome dieser Art von Muskeldystrophie sind, wie auch beim porzinen Stresssyndrom, Maulatmung, eine rote bis blaue Hautverfärbung, fleckige Haut, Muskeltremor, Vokalisationen und Bewegungsunwilligkeit. Sie treten plötzlich bei Stress oder einer Inhalationsnarkose auf. Bei der genetischen Untersuchung wurde eine Punktmutation, welche im Exon 41 des Dystrophin-Genes zum Austausch von Arginin zu Tryptophan führt, als Ursache gefunden. Bei den männlichen betroffenen Schweinen und den weiblichen Trägartieren war an dieser Stelle Tryptophan zu finden, bei den nicht betroffenen Schweinen Arginin. Auch bei der histopathologischen und immunhistologischen Untersuchung der Herz- und Skelettmuskulatur stellte man die Befunde einer Dystrophie, wie Nekrosen, Faserdegenerationen und eine Reduktion des Dystrophinproteins fest. Diese Art der Veränderung des Dystrophin-Genes führt demnach zu einer Sonderform des porzinen Stresssyndroms (Nonneman et al. 2012).

3. Material und Methoden

3.1. Schlachtkörper

Im Zuge einer routinediagnostischen Abklärung von veränderten Muskeln von Schlachtschweinen in einem steirischen Schlachthof schickte der entsprechende fleischuntersuchende Tierarzt Muskulatur zweier Schlachtkörper mit weißen Infiltraten an die Schweineklunik der Veterinärmedizinischen Universität Wien. Das Muskelfleisch hatte eine blasse Farbe und war von Fettgewebe durchsetzt (Abb. 7). Die eingeschickten Proben wurden an der Vetmeduni Vienna für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Die beiden Schlachtkörper werden als Schlachtkörper 250 und 253 bezeichnet.



Abb. 7: Verändertes Muskelfleisch der beiden steirischen Schlachtschweine

3.2. Histopathologische und immunhistochemische Untersuchung

Diese histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden bereits vor Beginn der Diplomarbeit durch Mitarbeiter des Institutes für Pathologie durchgeführt.

Um die Ergebnisse der histologischen Untersuchung des Falles von BMD in Japan mit denen in Österreich vergleichen zu können, wurden Gewebeproben von den eingeschickten Muskeln entnommen.

Die Fixierung dieser Gewebeproben erfolgte für mindestens 24 Stunden in einer 4%igen gepufferten Formaldehydlösung. Nach dem Einlegen in die Einbettkassetten wurden die Proben in Metallkörben in den Tissue-Tek-Infiltrationsprozessor (Sanova®, Wien, Österreich) gegeben, welcher auf das Standardprogramm eingestellt war. Danach wurden die Einbettkassetten aus dem Metallkorb entnommen, die Proben in Ausgießschälchen gelegt und in der Ausgießstation mit flüssigem Paraffin befüllt. Nach dem Aushärten auf einer Kühlplatte wurden die Präparate aus den Ausgießschalen entnommen.

Zur Vorbereitung auf das Schneiden wurden die Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte für 10 Minuten vorgekühlt. Nach dem Einspannen in das Mikrotom erfolgte das Antrimmen der Blöcke mit einer Schnittstärke von 20 Mikrometer (μm), bis ein guter Anschnitt des Präparats sichtbar war. Danach wurde auf eine Schnittstärke von 2–3 μm umgestellt, um die Oberfläche zu glätten. Zur Schnittgewinnung wurden Schnittstärken von 1–2 μm verwendet. Die Schnitte mussten dann vorsichtig von der Klinge des Mikrotoms gelöst und in ein kaltes Wasserbad gegeben werden. Danach folgte ein warmes Wasserbad mit entsalztem Wasser und einer Temperatur von 45 °C, damit sich die Schnitte streckten. Anschließend wurden die Schnitte auf einem sauberen und beschichteten Objektträger aufgebracht und mit feuchtem Filterpapier abgepresst. Die Trocknung der Objektträger mit den Präparaten erfolgte bei 60 °C für mindestens 20 Minuten.

Da die Präparate anschließend gefärbt werden sollten, musste das Paraffin vollständig entfernt werden. Dafür wurde das Präparat zuerst für zehn Minuten in das Lösungsmittel Neoclear (Merck NeoClear®, 109843) eingelegt. Dann erfolgte die Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Zuerst wurde der Objektträger zweimal für eine Minute in 100%igem Alkohol geschwenkt, dann jeweils einmal für eine Minute in 96%igem und 70%igem Alkohol und abschließend wurde er mit destilliertem Wasser gut gespült, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Nach diesem Schritt war der Objektträger bereit für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Dabei wurde nach folgendem Färbeprotokoll vorgegangen: Zuerst wurden die Objektträger für zehn Minuten in Hämatoxylin nach Ehrlich gelegt und nach einer gründlichen Spülung mit Leitungswasser folgte dann eine kurze Differenzierung in 1%igem Salzsäure-Alkohol. Danach wurden die Objektträger für zehn Minuten fließend gewässert und kurz mit destilliertem Wasser gespült. Daraufhin erfolgte ein dreimaliges Eintauchen in eine 0,5–1%ige Eosinlösung mit anschließender Spülung mit Leitungswasser.

Die Differenzierung fand in 70%igem und 96%igem Alkohol statt. Zum Schluss wurde der Objektträger noch in einer aufsteigenden Alkoholreihe, einmal bei 96 % und zweimal bei 100 %, entwässert und dann in Lösungsmittel eingestellt. Um eine gute Qualität und lange Haltbarkeit der Präparate zu gewährleisten, wurden die Schnitte mit dem Eindeckmedium Neomount eingedeckt.

Für die immunhistochemische Untersuchung wurde die Zwei-Schritt-Polymermethode angewendet. Bei dieser wird das Gewebe zuerst mit einem Primärantikörper und dann mit einem Sekundärantikörper mit enzymmarkiertem Polymer inkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein Kontrollschnitt, der sicher Dystrophin enthielt, mitgeführt.

Vom Paraffinblock wurden mit dem Mikrotom Schnitte einer Stärke von 2 µm angefertigt. Nach der Streckung im warmen Wasserbad und dem Aufziehen des Schnittes auf einen beschichteten Objektträger wurde das Präparat für 30 Minuten in einen 60 °C warmen Wärmeschrank gegeben, um die Anhaftung des Gewebes auf dem Objektträger zu verbessern. Danach erfolgte die Entparaffinierung. Dafür wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Begonnen wurde mit einem Einlegen des Schnittes zweimal für fünf Minuten in Lösungsmittel (Merck NeoClear®, 109843), dann legte man den Schnitt zweimal für fünf Minuten in 100%igen Alkohol, einmal für fünf Minuten in 96%igen Alkohol und einmal für fünf Minuten in 70%igen Alkohol. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Präparat in destilliertem Wasser gelagert. Die anschließende Antigen-Demaskierung wurde mithilfe des heat induced epitope retrieval-(HIER)-Verfahrens durchgeführt. Dazu wurde der Modultank (Thermo Scientific™ Lab Vision™ PT-Modul) bei einem pH-Wert von acht (Thermo Scientific PT Module Buffer, TA-XXX-PM2X) verwendet. Nach dem Einlegen des Schnittes in den Modultank wurde ein Programm gestartet, welches die Permeabilität des Gewebes erhöhte und die Epitope freilegte, sodass diese für die Bindung des Antikörpers zugänglicher wurden. Das Programm begann mit einer Erhitzung des Puffers auf 84 °C, dann kam die Probe hinzu und es folgte eine Erhitzung auf 97 °C. Danach fand eine Inkubation für 20 Minuten bei 97 °C mit anschließender Abkühlung auf 84 °C statt. Zum Schluss wurde die Probe entnommen und bei Raumtemperatur, in einem Waschpuffer (Thermo Scientific Tris Buffered Saline and Tween 20, TA-XXX-TT) eingelegt, abgekühlt.

Für die weiteren Schritte wurde der Autostainer 360 (Lab Version, Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland) verwendet. Zur Vorbereitung wurde dieser mit den nötigen

Informationen programmiert, woraufhin man für jeden Schnitt einen Aufkleber mit den wichtigsten Informationen und einem Barcode sowie eine Auflistung und Mengenangabe der benötigten Reagenzien erhielt. Der Schnitt wurde in den Autostainer gelegt und mit Waschpuffer bedeckt, dann wurde das Rack mit den nötigen Reagenzien hineingestellt und der Lauf gestartet. Zuerst erfolgte ein Waschschrift mit Waschpuffer, dann kam eine Wasserstoffperoxid-Lösung (Thermo Scientific UltraVision Peroxide Block, TA-XXX-H2O2Q) für fünf Minuten hinzu, um die Peroxidaseaktivität zu hemmen. Nach dem nächsten Waschschrift wurden unspezifische Hintergrundfärbungen mithilfe des Protein Blocks (Thermo Scientific UltraVision Protein Block, TA-XXX-PBQ) reduziert. Danach schloss sich ein Waschschrift an. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper (Labvision (NeoMarkers) Dystrophin Ab-1 (Clone 1808) Cat.#MS-486-P0, -P1, oder -P, monoklonal Maus, verdünnt 1:100 mit Antibody Diluent 500 Milliliter (ml) von life technologies) für 30 Minuten. Nach dem nächsten Waschschrift wurde der zweite Antikörper (Immunologic BrightVision+ Poly-HRP-Anti Mouse/Rabbit IgG Biotin-free, ready-to-use, DPVM-HRP) für 30 Minuten zum Schnitt hinzugegeben. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift. Nach diesem fand eine fünf minütige Inkubation in Chromogen (Thermo Scientific DAB Quanto (HRP), TA-XXX-QHSX) statt und danach wieder ein Waschschrift. Der vorletzte Schritt war die ein minütige Gegenfärbung mit Hämalaun (Thermo Scientific Mayer's Hämatoxylin, TA-XXX-MH). Nach dem letzten Waschschrift wurde der Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült. Dann konnte der Schnitt aus dem Autostainer entnommen werden und nach einer Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe in Lösungsmittel eingestellt werden. Zum Schluss wurde das Präparat mit Neoclear (Merck NeoMount®, 109016) eingedeckt.

3.3. DNA Isolierung und Polymerase-Kettenreaktion zur Geschlechtsbestimmung

Die PCR-basierte Geschlechtsbestimmung der Muskelproben wurde bereits vor Beginn der Diplomarbeit von Mitarbeitern des Institutes für Tierzucht und Genetik durchgeführt.

Von den beiden eingeschickten Schlachtkörpern 250 und 253 wurde Material für die Isolierung der DNA mit anschließender PCR zur Geschlechtsbestimmung der Schweine gewonnen. Die Untersuchungen wurden gleichzeitig an Blutproben eines männlichen und eines weiblichen Schweines zur Kontrolle durchgeführt (Sperveslage).

Die Isolation der genomischen DNA wurde mit dem Nexttec™ DNA Isolationskit für Gewebe und Zellen durchgeführt. Dieses beinhaltet folgende Komponenten: Puffer G, Proteinase K, Prep-Lösung, Nexttec™ cleanPlates96, Nexttec™ deep-well plate Dichtungsbänder und Alu-Dichtungsbänder. Zur Equilibrierung der Platten wurden jeweils 350 Mikroliter (µl) der Prep-Lösung in jede Vertiefung der Nexttec™ cleanPlate96 hineingegeben und diese, nach einer Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur, bei 350 Erdbeschleunigung (g) für eine Minute zentrifugiert. Danach wurde die zentrifugierte Mikrotiterplatte auf eine frische deep-well Platte gestellt. Je 5–20 Gramm (g) der Skelettmuskelproben 250 und 253 und der Kontroll-Blutprobe wurden in einem Reaktionsgefäß bei 2000 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde anschließend abgekippt. Zu jeder Probe wurden dann 140 µl Puffer G und 10 µl Proteinkinase K hinzugegeben. Nach dem Verschluss der Reaktionsgefäße mit einem Alu-Dichtungsband folgte eine Inkubation bei 56 °C und 1200 Umdrehungen pro Minute (rpm) für mindestens 30 Minuten. Der entstandene Überstand wurde auf die vorbereitete nexttec™ cleanPlate96 aufgebracht, für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend nochmal für eine Minute bei 700 g zentrifugiert. Das resultierende Gemisch enthielt die isolierte DNA (Sperveslage).

Die für die PCR zur Geschlechtsbestimmung benötigten Primer wurden über die Webseite des National Center for Biotechnology Information und einem Internetprogramm zur Herstellung von Primern gewonnen. Sie stammen aus der geschlechtsbestimmenden Region des Y-Chromosoms (SRY) und der nicht geschlechtsbestimmenden Region eines Zink-Finger-Genes (ZFX), welches sowohl auf dem X- als auch auf dem Y-Chromosom vorkommt. Die Spezifität wurde mit Hilfe eines Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)-Programmes, durch den Vergleich mit in einer Datenbank gesammelten porzinen genomischen Sequenzen, überprüft. Mit folgenden Forward (F) und Reverse (R) Primersequenzen wurde die PCR durchgeführt:

SRY_F GGG AAA GGC TCC TCA CTA TTT

SRY_R AGG GAT ACA TCC TCT CCT CTA C
 ZFX_F GTG CTG CTT TGT CTT GGA ATG
 ZFX_R GAG GGA GTT AGG TCT GGA TAC T

Zunächst wurden die Positiv- und die Negativkontrolle vorbereitet. Für die Negativkontrolle wurde ein Reaktionsgefäß ohne Template verwendet, in das Reaktionsgefäß für die Positivkontrollen wurden je 1 µl der Blutproben von den Schweinen mit bekanntem Geschlecht hineingegeben. Diese beiden Referenzproben und die Muskelproben durchliefen die PCR zur Geschlechtsbestimmung gleichermaßen. Um den Master-Mix herzustellen, wurde eine vorgefertigte Mischung an PCR-Enzymen mit den Primern, der Nuklease und Wasser gemischt. Anschließend wurden 1 µl des aus der DNA-Isolierung gewonnenen Lysates, welches als Template diente, zum Master-Mix hinzugefügt. Im Thermocycler folgten, nach einer drei-minütigen Inkubation bei 95 °C, 35 Zyklen, die aus jeweils drei Teilen bestanden. Zuerst kam es zur Denaturierung durch eine Erhitzung auf 98 °C für 20 Sekunden, dann folgte die Primerhybridisierung bei 63 °C für 15 Sekunden und zuletzt fand die Elongation bei 72 °C für 15 Sekunden statt. Die erwartete Amplikonlänge betrug bei SRY 400 Basenpaare (bp) und bei ZFX 506 bp. Abschließend wurden die Proben nochmal für eine Minute bei 72 °C inkubiert und dann bis zur Verwendung in der Gelelektrophorese bei 4 °C gelagert. Zur Vorbereitung der Elektrophorese wurde das grün-fluoreszierende DNA-Färbemittel in angemessener Menge zu dem 1,5%-igen Agarosegel hinzugegeben. 1,5 µl dieser Mischung wurden jeweils mit den Proben gut vermischt und dann für die Durchführung der Gel-Elektrophorese verwendet. Zur Auswertung wurden die Intensitäten der Banden mit einem Laserscanner gemessen und fotografiert (Blanes et al. 2016).

3.4. Befragung der Tierärzte

Um die Häufigkeit des Auftretens der Fatty muscular dystrophy in österreichischen Schlachtschweinen zu ermitteln, wurde ein Fragebogen erstellt. Dieser wurde an Tierärzte aus Niederösterreich, Oberösterreich, Kärnten und der Steiermark, die in der Schlachttier- und Fleischuntersuchung tätig sind, per E-Mail versendet. Diese Teile Österreichs wurden aufgrund ihrer höheren Dichte an Schweinebetrieben, im Gegensatz zu den restlichen Bundesländern, ausgewählt. Auch Schlachthofbetreibern und Zerlegebetrieben in den genannten Bundesländern wurde der Fragebogen, mit der Bitte, diesen an die dort tätigen

Tierärzte weiterzugeben, zugeschickt. Insgesamt wurde die Befragung im Zeitraum von Mai 2019 bis November 2019 in vier Runden an 94 E-Mail-Adressen verschickt. Zur Auswertung kamen 13 ausgefüllte Fragebögen zurück, sowie eine Rückmeldung per Telefon nach Beendigung der Befragung. Aufgrund der geringen Anzahl an Rückmeldungen wurden keine statistischen Berechnungen durchgeführt, sondern lediglich eine deskriptive Auswertung erstellt.

Der Fragebogen war untergliedert in personenbezogener Daten und Fragen zum Auftreten der fettigen Muskeldystrophie. Die Bekanntgabe personenbezogenen Daten war freiwillig. Im Weiteren wird aber aufgrund des Datenschutzes darauf verzichtet, personenbezogene Daten bekannt zu geben. Die Gestaltung des Fragebogens wurde bewusst sehr kurz und minimalistisch gestaltet, um dadurch die Rücklaufquote möglicherweise zu erhöhen.

Nach der Angabe des Bundeslandes folgte die Frage, ob die genannten Veränderungen schon einmal bei der Fleischschau beobachtet wurden. Bei einer Bestätigung sollte dann die Häufigkeit grob eingeschätzt werden und anschließend die betroffenen Muskelpartien angegeben werden. Danach wurden die Tierärzte noch nach dem Ausmaß der Fettinfiltration in den betroffenen Muskeln und eventuellen Auffälligkeiten bei der vorherigen Lebendtieruntersuchung gefragt. Es wurden jeweils mögliche Antworten zum Ankreuzen vorgegeben, aber es gab auch die Möglichkeit, eigene Angaben hinzuzufügen (Abb. 8). Zusätzlich zum Fragebogen, wurde eine Erklärung des Krankheitsbildes mit Bildern der Schlachtkörper des in der Steiermark entdeckten Falles von fettiger Muskeldystrophie versendet (Abb. 9).

Fragebogen "Fettige Muskeldystrophie beim österreichischen Schlachtschwein"

im Rahmen der Diplomarbeit von Carolin Schöner

Telefonnummer: 0049176/ 57635334; E-Mail: schoener.carolin@gmx.de

Betreuer der Diplomarbeit: Dr. med.vet. Lukas Schwarz;

E-Mail: lukas.schwarz@vetmeduni.ac.at

Datum	_____
Name (freiwillige Bekanntgabe)	
Schlachthof (freiwillige Bekanntgabe)	
Bundesland	
Haben Sie die genannten Veränderungen schon einmal beobachtet?	☐ ja ☐ nein

Wenn ja:

Schätzung der Häufigkeit	ca. _____ mal im Monat ca. _____ mal im Jahr ca. _____ mal in den letzten 5 Jahren
Betroffene Muskelpartien	☐ Glutealmuskulatur ☐ Lendenmuskulatur ☐ sonstige Muskeln: _____
Ausmaß der Fettinfiltration der betroffenen Muskeln	☐ < 20% ☐ 20%- 40% ☐ 40%- 60% ☐ 60%- 80% ☐ > 80%
Befunde bei der Lebendtieruntersuchung	☐ keine ☐ Lahmheit ☐ sonstige: _____ ☐ nicht beurteilbar

Die Daten werden anonym behandelt und nicht an Dritte weitergegeben.

Herzlichen Dank für Ihre Mitarbeit!

Abb. 8: Fragebogen zur Erhebung des Auftretens von Veränderungen welcher der fettigen Muskeldystrophie entsprechen.

Fettige Muskeldystrophie

Die fettige Muskeldystrophie ist eine fortschreitende degenerative Erkrankung der quergestreiften Muskulatur. Durch einen Defekt im Genom kommt es zur Fehlfunktion oder zur Größenabweichung des im Sarkolemm vorkommenden Proteins Dystrophin. Die Erkrankung verläuft analog zur sogenannten Becker-Muskeldystrophie des Menschen und wird beim Schwein höchstwahrscheinlich auch X-chromosomal vererbt.

Im Verlauf der Krankheit kommt es zur progressiven Muskeldegeneration und zum Verlust von Muskelfasern. Das fehlende Muskelgewebe wird durch Fettgewebe ersetzt, sodass äußerlich keine Atrophie zu erkennen ist. Durch die Fettinfiltrationen stellt sich die Muskulatur, wie auf den folgenden Bildern zu sehen ist, blass und je nach Schweregrad unterschiedlich stark hell verfärbt dar.

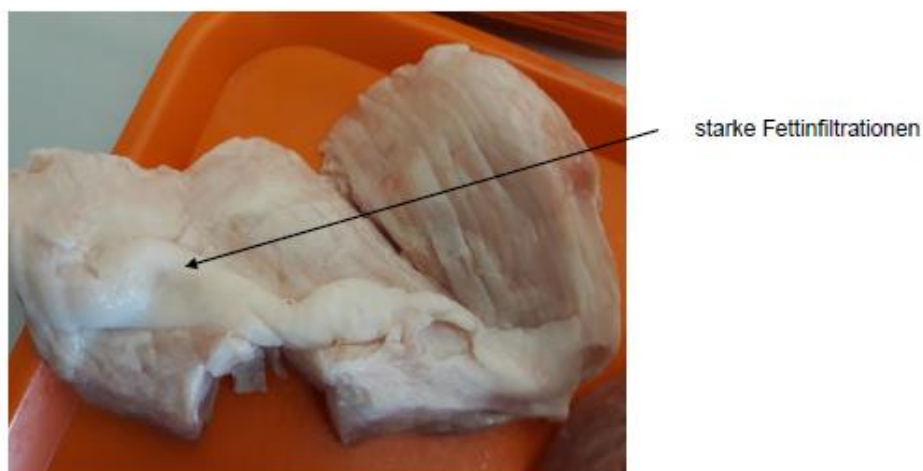
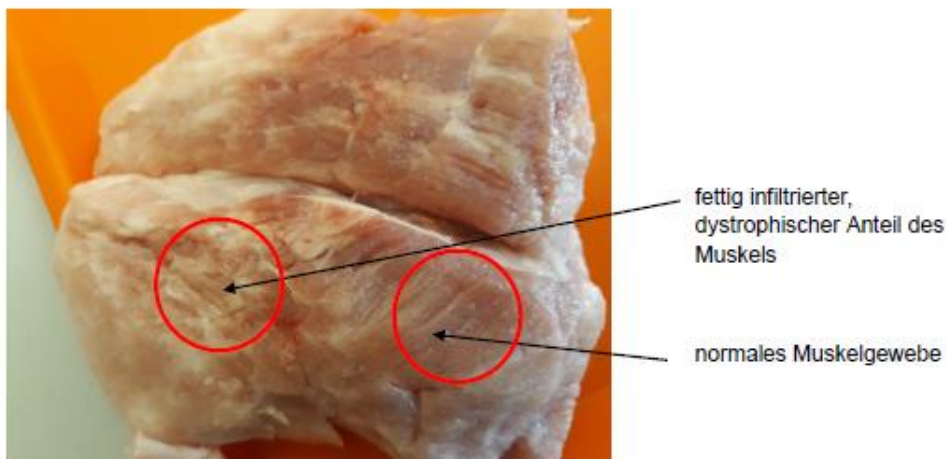


Abb. 9: Anhang der E-Mail zur Umfrage: Kurze Erklärung des Krankheitsbildes mit Bildern des betroffenen Schlachtkörpers aus der Steiermark

4. Ergebnisse

4.1. Histopathologische und immunhistochemische Untersuchung

Zur histologischen Untersuchung des Schlachtkörpers 250 wurden von zwei Skelettmuskeln Präparate angefertigt. In beiden war eine diffuse interstitielle Einlagerung von Fettgewebe sichtbar. Einzelne Muskelfasern zeigten Hinweise auf eine beginnende hyalinschollige Muskeldegeneration und in wenigen Muskelfasern waren Degenerationserscheinungen mit zentral liegenden Kernen nachweisbar. Anhaltspunkte für Myophagie oder Faseraufspaltungen gab es bei beiden Proben nicht. Vereinzelt waren Stellen mit geringgradigen perivaskulären, nicht eitrigen Infiltraten um kleine interstitielle Arterien herum vorhanden (Abb. 10).

Auch aus der Skelettmuskulatur des Schlachtkörpers 253 wurden zwei Proben histologisch untersucht. Wie auch beim anderen Schlachtkörper fielen die interstitielle Einlagerung von Fettgewebe, hyalinschollige Muskeldegeneration und zentral liegende Zellkerne auf. Hinweise auf Myophagie oder Faseraufspaltungen gab es auch hier nicht. Zusätzlich zu diesen Befunden konnte man in den beiden Muskelproben auch Hinweise auf eine Verquellung in einzelnen Muskelfasern und eine Atrophie vieler Muskelfasern in Gebieten mit starker Fettinfiltration sehen.

Die immunhistochemische Untersuchung der Proben beider Schlachtkörper ergab eine deutlich verminderte Expression von Dystrophin im Sarkolemm (Abb. 11). Bei Schlachtkörper 253 war zusätzlich eine Verlagerung der Dystrophinexpression ins Innere der Muskelfaser erkennbar.

Die Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Untersuchung sprechen dafür, dass bei den untersuchten Muskeln der Schlachtkörper 250 und 253 mit hoher Wahrscheinlichkeit eine fettige Muskeldystrophie vorlag.

Vergleicht man diese Befunde mit den histologischen Auffälligkeiten des Falles von BMD beim Schwein in Japan, kann man einige Gemeinsamkeiten feststellen. Bei beiden gibt es einen erhöhten Anteil an Fettgewebe in der Muskulatur, eine hyalinschollige Degeneration und zum Teil zentral liegende Zellkerne. Die Myophagie und Faserspaltungen, die in Japan auffielen, traten bei den beiden Schlachtkörpern aus der Steiermark nicht auf.

Übereinstimmend sind auch die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung, da in beiden Fällen das Dystrophin eine reduzierte Anfärbbarkeit aufwies.

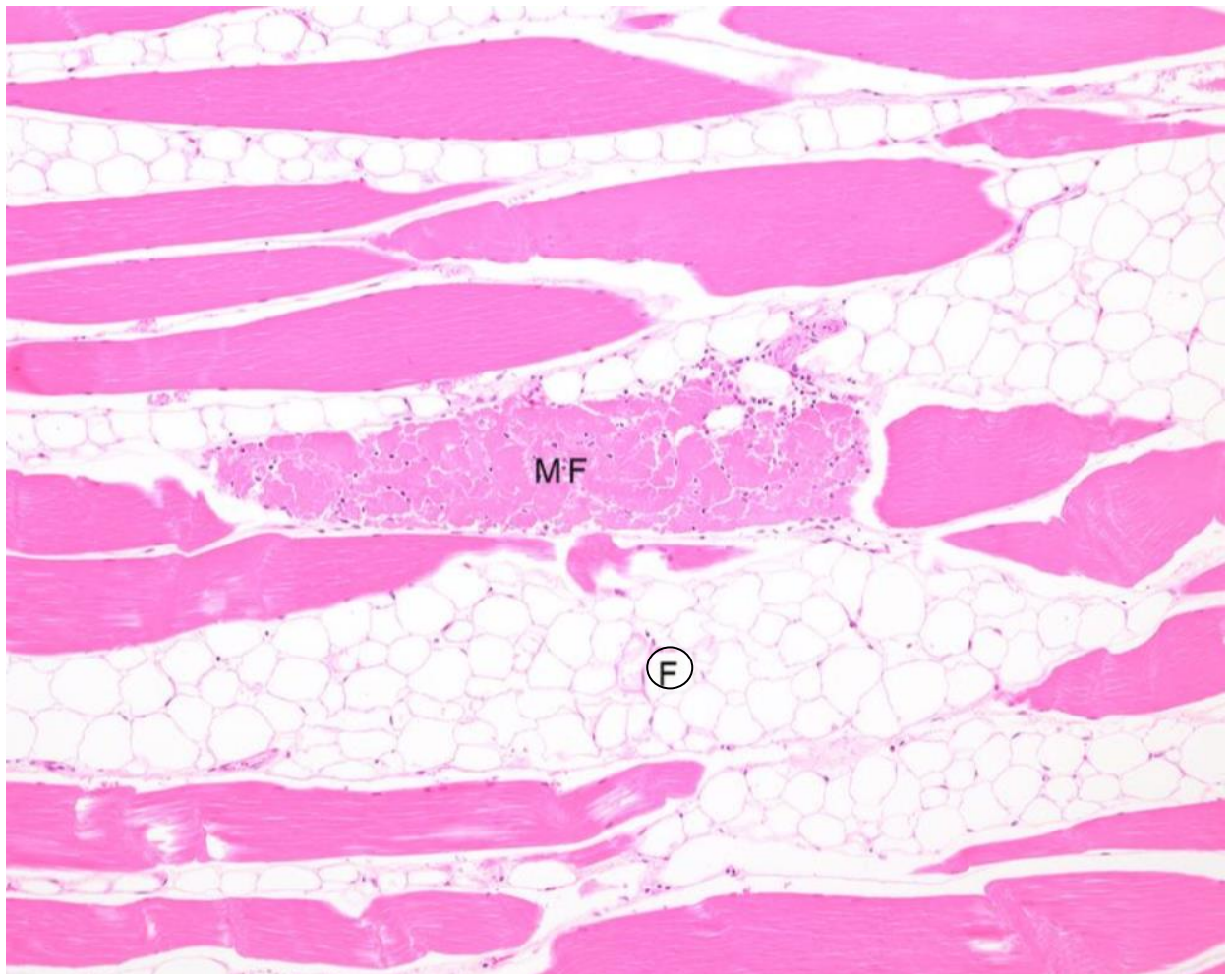


Abb. 10: Histologisches Bild der Skelettmuskulatur eines von der fettigen Muskeldystrophie betroffenen Schlachtkörpers aus der Steiermark; mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt; MF: hyalinschollige Muskelfaserdegeneration mit entzündlicher Begleitreaktion; (F): eingelagertes Fettgewebe

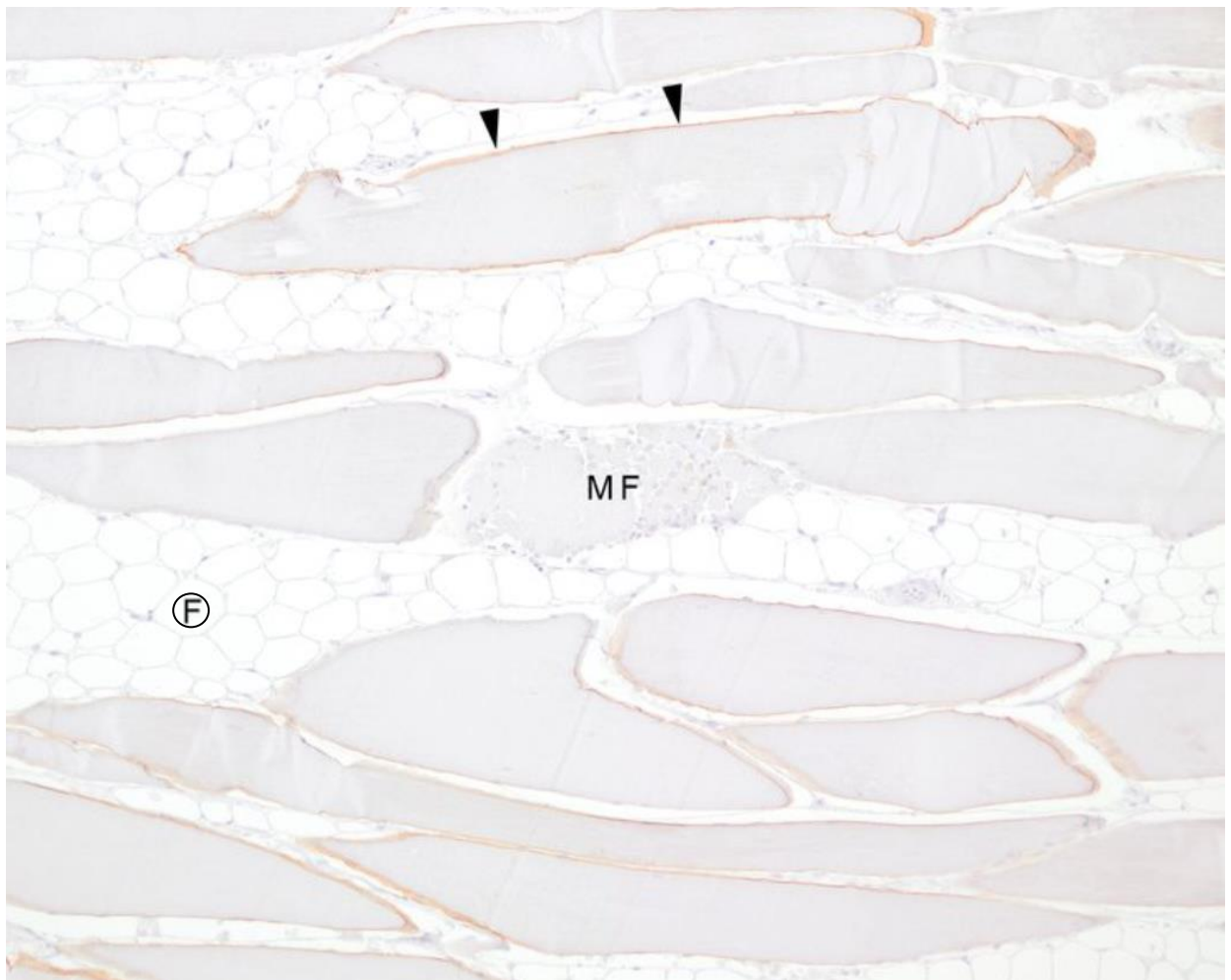


Abb. 11: Immunhistochemisch gefärbtes histologisches Präparat der Skelettmuskulatur eines betroffenen Schlachtkörpers mit sichtbarer Reduktion der Anfärbbarkeit von Dystrophin; MF: hyalinschollige Muskelfaserdegeneration; (F) eingelagertes Fettgewebe; Pfeile: Dystrophinfärbung einer gesunden Muskelzelle

4.2. Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktion zur Geschlechtsbestimmung

Auf dem Ausdruck der Gel-Elektrophorese (Abb. 12) sind bei der Muskelprobe des Schlachtkörpers 250, sowie bei der Referenzprobe des männlichen Schweines zwei Banden zu sehen. Die weibliche Referenzprobe und die Muskelprobe des Schlachtkörpers 253 haben in der Elektrophorese jeweils eine Bande ergeben. Bei der Negativkontrolle sind keine Banden sichtbar. Das Ergebnis der geschlechtsbestimmenden PCR besagt, dass die Muskelprobe des

Schlachtkörpers 250 von einem männlichen Schwein stammte und die Probe des Schlachtkörpers 253 von einem weiblichen.

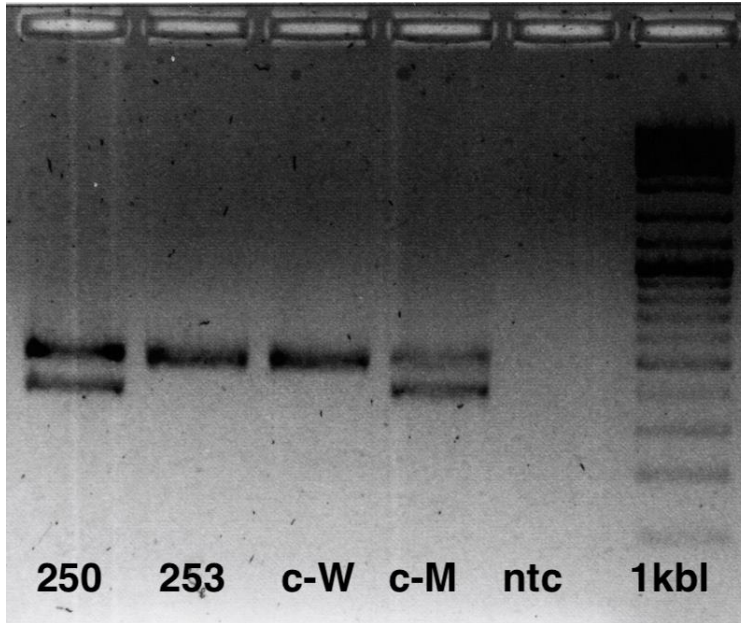


Abb. 12: Ergebnis der Gel-Elektrophorese: c-W= weibliche Kontrollprobe; c-M= männliche Kontrollprobe; ntc= Negativkontrolle; 1kbl= 1kb Leiter

4.3. Ergebnisse der Befragung

Die Ergebnisse der Befragung der Tierärzte sind in der untenstehenden Tabelle eingetragen. Nach dem Ende der Befragung meldete sich zudem noch ein Tierarzt aus Oberösterreich und teilte uns mit, dass er die beschriebenen Veränderungen nun auch bei einem Schlachtschwein aus Oberösterreich beobachtet hat (Abb. 13).

Tabelle zur Darstellung der Ergebnisse der Befragung

Bundesland	Schlachthof	Veränderungen beobachtet?	Schätzung der Häufigkeit	Betroffene Muskelpartien	Ausmaß der Fettinfiltration	Befunde bei der Lebendtieruntersuchung
Steiermark	1	ja	5 mal im Jahr	Gluteal- und Lendenmuskulatur	20 % – 40 %	keine
Steiermark	1	ja	4 mal im Jahr	Gluteal- und Lendenmuskulatur	20 % – 40 %	keine
Steiermark	1	ja	10 mal im Jahr	Gluteal- und Lendenmuskulatur	40 % – 60 %	keine

Steiermark	1	ja	1 mal im Monat	Gluteal- und Lendenmuskulatur	20% – 40 %	keine
Steiermark	1	ja	1-2 mal im Monat	Gluteal- und Lendenmuskulatur	20 % – 80 %	keine
Steiermark	2	nein				
Steiermark	3	ja	1 mal im Jahr	Glutealmuskulatur, Musculus longissimus dorsi	20 % – 40 %	keine
Steiermark	3	ja	1 mal in den letzten 5 Jahren	Gluteal- und Lendenmuskulatur	20 % – 40 %	nicht beurteilbar
Steiermark	4	ja	vereinzelt	unter anderem Diaphragmamuskulatur		
Niederösterreich	5	ja	2-3 mal im Jahr	Glutealmuskulatur	40 % – 60 %	nicht beurteilbar
Oberösterreich	6	nein				
Oberösterreich	6	nein				
Kärnten	7	nein				

Am häufigsten wurde die Muskeldystrophie in der Steiermark wahrgenommen, aber auch in Niederösterreich und in Oberösterreich tritt sie auf. Im Schlachthof eins ist die Häufigkeit mit von viermal im Jahr bis zu ein bis zweimal im Monat am höchsten. Auch auf anderen Schlachthöfen in der Steiermark konnte die Erkrankung in den letzten Jahren gelegentlich festgestellt werden. Seltener kam sie in Oberösterreich und Niederösterreich vor. Als betroffene Muskelpartien wurde fast immer die Gluteal- und Lendenmuskulatur angegeben, jeweils einmal auch der *Musculus longissimus dorsi* und die Muskulatur des Zwerchfells. Das Ausmaß der Fettinfiltration betrug in den meisten Fällen zwischen 20 % und 40 %, vereinzelt aber auch bis zu 80 %. Bei der Lebendtieruntersuchung konnte man in keinem Fall Auffälligkeiten feststellen oder die Befunde waren nicht mehr beurteilbar.



Abb. 13: Fettinfiltration der Muskulatur eines Schlachtkörpers aus Oberösterreich

5. Diskussion

Vergleicht man die histopathologischen und immuhistochemischen Befunde des im Zuge dieser Arbeit untersuchten Muskelgewebes mit denen aus Japan, sind die grundlegenden Veränderungen gleich. Bei beiden konnten eine starke fettige Infiltration der Muskulatur, eine hyalinschollige Degeneration und zentral liegende Zellkerne festgestellt werden. Auch in der immunhistologischen Untersuchung wurde bei beiden eine Verminderung des Dystrophins im Sarkolemm festgestellt. Eine Art der DMD konnte man in beiden Fällen ausschließen, da das Dystrophin nicht vollständig fehlte und keine Beeinträchtigung der Muskelfunktion bei der Lebertieruntersuchung auffiel. Diese Befunde sprechen dafür, dass man in beiden Fällen von einer BMD beim Schwein sprechen kann, sofern man einen Vergleich zur Humanmedizin herstellen möchte. Myophagie, Faseraufspaltungen, Nekrosen und Fibrosen wie in Japan konnten bei den Schlachtkörpern aus der Steiermark nicht festgestellt werden. Die Ursache dafür ist möglicherweise eine unterschiedliche Lokalisation der Mutation im Dystrophin-Gen. Die Beeinträchtigung der Proteinfunktion könnte dadurch anders sein und möglicherweise zu den unterschiedlichen histologischen Ausprägungen führen. Auch bei der Entwicklung von Schweinemodellen für die BMD und DMD stellte man fest, dass die Lokalisation der genetischen Veränderung die Krankheitsausprägung beeinflusst. So führte beispielsweise bei einem Minipig eine Mutation an der zentralen Stabdomäne zu milden Symptomen (Selsby et al. 2015). Eine Genmodifikation am Exon 52 bei einem anderen Schwein löste aber eine schwerwiegende DMD aus (Klymiuk et al. 2013). Ein weiteres Beispiel für die Variabilität der Krankheitsausprägung ist der erwähnte Fall aus den vereinigten Staaten von Amerika, bei dem eine Punktmutation im Exon 41 des Dystrophin-Gens Symptome wie beim porzinen Stresssyndrom, zusätzlich zu den klassischen Befunden einer Muskeldystrophie in der Herz und Skelettmuskulatur, ausgelöst hat und damit eine Sonderform der fettigen Muskeldystrophie darstellt (Nonneman et al. 2012). Der Fall aus der Steiermark unterscheidet sich demnach histologisch leicht von dem aus Japan, weil wahrscheinlich unterschiedliche Exons durch die genetische Veränderung beeinträchtigt waren.

Bei der Befragung konnte festgestellt werden, dass die Erkrankung nicht nur in Schweinen in der Steiermark, sondern auch in Niederösterreich und Oberösterreich in Erscheinung trat. Am häufigsten wurde jedoch von Fällen aus der Steiermark berichtet. Da die Tierärzte, die eine positive Rückmeldung zum Auftreten der fettigen Muskeldystrophie machten, zum

überwiegenden Anteil regelmäßig und mehrmals in großen Schlachtbetrieben tätig sind, können die Ergebnisse als relevant gesehen werden. Besonderes Augenmerk sei auf Schlachthof eins gelegt, wo entsprechende Muskelveränderungen ein bis zweimal pro Monat beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass es in der Steiermark eine oder mehrere Zuchtlinien gibt, die die Erkrankung an ihre Nachkommen weitergeben. Weitere Fälle findet man jedoch vereinzelt auch in anderen Bundesländern. Dabei wäre es interessant zu wissen, ob die fettige Muskeldystrophie von der Steiermark aus nach Niederösterreich und Oberösterreich gebracht wurde, oder ob die Krankheit auch dort in den lokal vertretenen Zuchtlinien vorkommt. Um das zu klären, ist eine Untersuchung der wirtschaftlichen Beziehungen der Eberstationen und der Jungsauenproduzenten zwischen der Steiermark und den anderen Bundesländern, in denen die fettige Muskeldystrophie auftrat, in weiteren Studien notwendig. Weitere viehverkehrsbezogene Daten zu Mastschweinen wären hilfreich für die epidemiologische Einschätzung der fettigen Muskeldystrophie beim Schwein da Mastschweine bzw. Mastferkel nicht nur regional vermarktet werden, sondern teilweise über die Bundeslandgrenzen hinweg verkauft und geschlachtet werden. Um genauere Aussagen zum gehäuftem Auftreten der fettigen Muskeldystrophie in den steirischen Zuchtlinien machen zu können, wäre es zudem wichtig den Anteil ausländischer Genetik, zum Beispiel aus Dänemark, Deutschland oder Holland, in den steirischen Zuchtbeständen anhand von genauen Erhebungen genau zu bestimmen.

Ein anderer denkbarer Grund für das gehäufte Vorkommen in der Steiermark könnte aber auch die geringe Rücklaufquote der Befragung sein. Möglicherweise nahmen mehrere Tierärzte aus der Steiermark daran teil, während von einigen Fällen in den anderen Bundesländern nicht berichtet wurde. Es kann also nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass die Erkrankung vor allem in der Steiermark vorkommt, jedoch weisen die Ergebnisse der Befragung darauf hin.

Der Erbvorgang der fettigen Muskeldystrophie verläuft höchstwahrscheinlich gonosomal rezessiv (Horiuchi et al. 2014). Die häufigste Ursache ist demnach ein erkrankter Eber, der sein beschädigtes X-Chromosom an seine weiblichen Nachkommen vererbt. Werden diese Nachkommen dann als Zuchtsauen eingesetzt, können, auch wenn sie mit dem Samen eines gesunden Ebers besamt werden, erkrankte männliche Nachkommen entstehen. Aus diesem Grund ist es ein großer Zufall, dass eines der beiden eingesandten betroffenen Schweine

weiblich war. Dieses Schwein muss also zwei betroffene X-Chromosomen gehabt haben und damit war die Mutter eine asymptotische Trägerin und der Vater war entweder von der fettigen Muskeldystrophie betroffen oder zumindest Träger der Erbkrankheit. Dies spricht wiederum dafür, dass die Erkrankung in der Steiermark in der Schweinezucht schon verankert ist. Die Muttersau der betroffenen Schweine muss demzufolge mit Sperma eines Ebers besamt worden sein, welcher mit ziemlich großer Wahrscheinlichkeit selber an fettiger Muskeldystrophie erkrankt war oder noch erkranken wird. Hätte man das untersuchte Schwein als Zuchtsau eingesetzt, so müssten dieser Hypothese folgend alle männlichen Nachkommen erkranken und alle weiblichen Nachkommen wären Trägerinnen und würden unweigerlich zur Verbreitung der fettigen Muskeldystrophie beitragen. Dies würde einen hohen wirtschaftlichen Schaden nach sich ziehen, da der Schlachtkörper der männlichen Tiere durch die starke Fettinfiltration mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zur Fleischgewinnung brauchbar wäre und die weiblichen Trägerinnen in der Zucht die Krankheit weiterverbreiten könnten. Da in der Steiermark besonders in einem Schlachthof das Auftreten mit bis zu zweimal im Monat sehr häufig ist, ist es möglich, dass eine solche Kreuzung mit einer erkrankten Zuchtsau bereits erfolgt ist. Dies würde aber bedeuten, dass die erblich bedingte fettige Muskeldystrophie auch im Eberbestand bereits mehr oder weniger verbreitet ist. Besonders fatal wäre das Auftreten der fettigen Muskeldystrophie in einem Jungsaunenproduktionsbetrieb, da sich dadurch die Krankheit sehr schnell weiterverbreiten würde. Um dies zu verhindern wäre es sinnvoll, die Mutter- und Vaterlinien auf die Erbkrankheit zu untersuchen und somit die Weiterverbreitung aufhalten zu können.

Um die fettige Muskeldystrophie wieder aus der Zucht zu entfernen, müsste man die erkrankten Eber identifizieren und aus der Zucht ausschließen. Da die Krankheit aber nicht zur Ausprägung von Symptomen vor der Schlachtung führt, ist das nur mit Genanalysen möglich und damit sehr arbeits- und kostenaufwändig. Bevor man Überlegungen dazu anstellt, ist es nötig die wirtschaftlichen Folgen genauer zu berechnen. Außerdem ist noch nicht bekannt, ob die fettige Muskeldystrophie nur in bestimmten Rassen oder Kreuzungen vorkommt, oder ob alle Schweine gleichermaßen betroffen sein können. Um das herauszufinden wären Studien sinnvoll, die untersuchen, ob und zu welchem Anteil die Erkrankung bei der Landrasse, Edelschweinen, Duroc oder Pietrain vorkommt und ob sich die

Ausprägungen dabei unterscheiden. Mit den Ergebnissen können weitere Möglichkeiten zur Verhinderung der fettigen Muskeldystrophie entwickelt werden.

Die Befragung der Tierärzte hat zusammenfassend also das Ergebnis gebracht, dass die fettige Muskeldystrophie relativ oft in der Steiermark festgestellt wird, aber das Problem auch in den anderen Bundesländern, in denen es viele Schweinebetriebe gibt vorhanden ist. Um die fleischhygienischen Aspekte und Möglichkeiten der züchterischen Selektion weiterzuentwickeln, können aufbauend auf diese Ergebnisse weitere Studien folgen. Vielmehr wäre es sinnvoll die österreichischen Jungsauenzuchtbetriebe und Eberstationen auf das Vorhandensein von Mutationen im Dystrophingen zu untersuchen, um dadurch die fettige Muskeldystrophie beim Schwein gänzlich zu vermeiden.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Auftreten der fatty muscular dystrophy bei österreichischen Schlachtschweinen untersucht. Die Krankheit ist vor allem aus der Humanmedizin bekannt. Ursächlich hierbei ist eine Mutation im Dystrophin-Gen des X-Chromosoms, diese kann entweder den Leserahmen unterbrechen und damit zum schwerwiegenderen Krankheitsbild der Duchenne-Muskeldystrophie führen, oder der Leserahmen bleibt erhalten und es kommt zur milder verlaufenden Becker-Muskeldystrophie. Bei beiden Erkrankungen kommt es durch das Fehlen oder durch die Unvollständigkeit des Proteins Dystrophin im Sarkolemm zur Beeinträchtigung der Muskelfunktion. Das Schwein wurde bisher oft als Tiermodell zur Erforschung der Krankheit genutzt. Jedoch gab es in den letzten Jahren sowohl in Japan als auch einmal in der Steiermark spontane Fälle von fettiger Muskeldystrophie beim Schwein. Bei der Schlachtung stellte man fest, dass die Muskulatur dieser Schweine stark von Fett infiltriert war und somit konnte der Schlachtkörper als nicht genusstauglich klassifiziert werden. Anhand einer Befragung wurde in dieser Arbeit herausgefunden, dass die fettige Muskeldystrophie relativ häufig in der Steiermark vorkommt, aber auch in Oberösterreich und Niederösterreich eine Rolle spielt. Am häufigsten ist davon die Gluteal- und Lendenmuskulatur betroffen und das Ausmaß beträgt meistens 20 %–40 %. Bei der vorherigen Lebendtieruntersuchung konnten weder in Japan noch bei den Fällen in Österreich Auffälligkeiten beobachtet werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurden Muskeln zweier Schlachtkörper pathohistologisch, immunhistologisch und mit einer Polymerase-Kettenreaktion zur Geschlechtsbestimmung untersucht. Der pathohistologische und immunhistologische Befund stimmte mit dem Fall aus Japan größtenteils überein. Die Muskulatur war von Fettgewebe durchsetzt, zeigte Hinweise auf eine hyalinschollige Degeneration und zentral liegende Kerne und teilweise waren auch verquollene und atrophische Muskelfasern sichtbar. Im Gegensatz zu dem Fall aus Japan, konnten aber bei der histologischen Untersuchung der Schlachtkörper aus der Steiermark keine Myophagie, Faseraufspaltungen, Nekrosen und Fibrosen festgestellt werden. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich, dass bei den beiden Fällen unterschiedliche Exons betroffen waren und es dadurch zu einer leichten Änderung in der Krankheitsausprägung kam. Die Polymerase-Kettenreaktion zur Geschlechtsbestimmung ergab, dass eines der beiden erkrankten Schweine weiblich war, was bedeutet, dass beide X-Chromosomen von der

Mutation betroffen sein mussten. Das weist darauf hin, dass die fettige Muskeldystrophie eher in der steirischen Schweinezucht verankert ist. Ein Einsatz solcher betroffenen Tiere in der Jungsauenproduktion wäre durch die Weitervererbung fatal. Zur Vermeidung der fettigen Muskeldystrophie wäre ein Ausschluss betroffener Eber aus der Zucht und die Untersuchung der Mutter- und Vaterlinien sinnvoll. Außerdem ist es wichtig herauszufinden, ob die Fälle von fettiger Muskeldystrophie in Niederösterreich und Oberösterreich durch wirtschaftliche Verbindungen mit steirischen Ferkelproduzenten, Jungsauenproduzenten oder Eberstationen entstehen, oder die Krankheit auch hier in der lokal verbreiteten Schweinezucht vorkommt. Des Weiteren sollte durch genaue Erhebungen der Anteil ausländischer Genetik in der steirischen Schweinezucht überprüft werden, um gesicherte Aussagen zur Verbreitung der Erkrankung in dieser machen zu können.

7. Summary

The aim of this study was to determine the prevalence of fatty muscular dystrophy in Austrian slaughter pigs. This disease is especially known in human medicine. The cause is a mutation of the dystrophin gene of the X-chromosome. This can either interrupt the reading frame and thus lead to a more severe clinical manifestation of Duchenne-muscular-dystrophy, or the reading frame is unaffected and the less severe Becker-muscular-dystrophy occurs. In both cases the lack or incompleteness of the dystrophin protein leads to an impairment of the muscular function. So far, pigs often have been used as animal models to conduct research on this disease. However, in recent years there have been some spontaneous cases of Becker muscular dystrophy occurring in pigs, both in Japan and Styria. During the slaughter process it was observed, that muscles of these pigs were heavily infiltrated with fat and therefore the carcass had to be discarded. Based on a survey, this study found out that the fatty muscular dystrophy is relatively common in Styria, but also occurs in Upper Austria and Lower Austria. Most often gluteal- and lumbar-muscles were affected and the extend of affection was appproximately 20 %–40 %. During the examination of live animals before slaughtering, neither in Japan nor in Austria any abnormalities could be observed.

In this study muscles from two affected carcasses were investigated pathohistologically, immunohistologically and sex was determined using polymerase chain reaction. The pathohistological and immunohistological findings coincided more or less with the case from Japan. The muscle tissue was infiltrated by fat, showed signs of hyalinisation and centrally located nuclei and occasionally swollen and atrophic fibres were visible. In contrast to the case from Japan, the histological examination of the carcasses from Styria did not reveal any myophagia, fibre splitting, necrosis or fibrosis. This is probably due to the fact that in the two cases, different exons were affected, which led to a slight change in the disease outcome.

The sex determining polymerase chain reaction revealed that one of the affected pigs was female, which means, that both X-chromosomes must be affected by the mutation. This indicates an establishment of this disease in pig breeding in Styria. The use of such affected animals in the production of gilts would be fatal due to the inheritance. To avoid fatty muscular dystrophy, it would be useful to exclude affected boars from breeding and to examine the mother and father lines. It is also important to find out whether the cases of fatty muscular dystrophy in Lower Austria and Upper Austria are caused by economic connections

with Styrian gilts producers and boar stations, or if the disease may be established in the locally used breeds. Furthermore, the proportion of foreign genetics in Styrian pig breeding should be reviewed by investigations in order to be able to make reliable statements about the spread of the disease in Styria.

8. Literatur

- Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K, Specht L, Shapiro F, Angelini C, Sugita H, Kunkel LM. 1991. Exploring the Molecular Basis for Variability among Patients with Becker Muscular Dystrophy: Dystrophin Gene and Protein Studies. *Am. J. Hum. Genet*, 49(1):54–57.
- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. 2002. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological reviews*, 82(2):291–329.
- Blanes MS, Tsoi SCM, Dyck MK. 2016. Accurate and Phenol Free DNA Sexing of Day 30 Porcine Embryos by PCR. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (108):53301.
- Bushby K, Finkel R, Birnkrant D, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C. 2010. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet Neurology*, 9(1):77–93.
- Bushby KMD, Thambyayah M, Gardner-Medwin D. 1991. Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *The Lancet Neurology*, 337(8748):1022–1024.
- Carlson CG. 1998. REVIEW The Dystrophinopathies: An Alternative to the Structural Hypothesis. *Neurobiology of Disease*, 5(1):3–15.
- Hollinger K, Yang CX, Montz RE, Nonneman D, Ross JW, Selsby JT. 2014. Dystrophin insufficiency causes selective muscle histopathology and loss of dystrophin-glycoprotein complex assembly in pig skeletal muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(4):1600–1609.
- Horiuchi N, Aihara N, Mizutani H, Kousaka S, Nagafuchi T, Ochiai M, Ochiai K, Kobayashi Y, Furuoka H, Asai T, Oishi K. 2014. Becker Muscular Dystrophy- Like Myopathy Regarded as So- Called "Fatty Muscular Dystrophy" in a Pig: A Case Report and Its Diagnostic Method. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(2):243–248.
- Hu XY, Burghes AH, Ray PN, Thompson MW, Murphy EG, Worton RG. 1988. Partial gene duplication in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Journal of Medical Genetics*, 25(6):369–376.

Kawanri M, Mitsui T, Kawai H, Kobunai T, Tsuchihashi T, Saito S. 1996. Dystrophin, Utrophin and β -Dystroglycan Expression in Skeletal Muscle from Patients with Becker Muscular Dystrophy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 55(8):896–903.

Klymiuk N, Blutke A, Graf A, Krause S, Burkhardt K, Wuensch A, Krebs S, Kessler B, Zakhartchenko V, Kurome M, Kemter E, Nagashima H, Schoser B, Herbach N, Blum H, Wanke R, Aartsma-Rus A, Thirion C, Lochmüller H, Walter MC, Wolf E. 2013. Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Human molecular genetics*, 22(21):4368–4382.

Koenig M, Beggs AH, Moyer M et al. 1989. The Molecular Basis for Duchenne versus Becker Muscular Dystrophy: Correlation of Severity with Type of Deletion. *Am. J. Hum. Genet*, 45(4):498–506.

Nonneman DJ, Brown-Brandl T, Jones SA, Wiedmann RT, Rohrer GA. 2012. A defect in dystrophin causes a novel porcine stress syndrome. *BMC genomics*, 13():233.

Ohlendieck K, Swandulla D. 2017. Molekulare Pathogenese der Fibrose bei Muskeldystrophie vom Typ Duchenne. *Der Pathologe*, 38(1):21–29.

Osmose. Duchenne & Becker muscular dystrophy - causes, symptoms, treatment & pathology. <https://www.youtube.com/watch?v=DGOmN6rnsNk>. Zugegriffen: 19. Januar 2020

Selsby JT, Ross JW, Nonneman D, Hollinger K. 2015. Porcine models of muscular dystrophy. *ILAR journal*, 56(1):116–126.

Sperveslage J. Protocol DNA Isolation from Tissue & Cells by by nexttec™ 1-Step; - nexttec™ cleanPlate96 -. nexttec™ DNA isolation systems. https://www.nexttec.de/images/stories/pdf/protocol/2019/tissue/10N-Tissue_3.0_nexttec-cleanPlate96.pdf. Zugegriffen: 08. Januar 2020

Wilson K, Faelan C, Patterson-Kane JC, Rudmann DG, Moore SA, Frank D, Charleston J, Tinsley J, Young GD, Milici AJ. 2017. Duchenne and Becker Muscular Dystrophies: A

Review of Animal Models, Clinical End Points, and Biomarker Quantification. *Toxicologic pathology*, 45(7):961–976.

Wokke BH, Hooijmans MT, van den Bergen JC, Webb AG, Verschuuren JJ, Kan HE. 2014. Muscle MRS detects elevated PDE/ATP ratios prior to fatty infiltration in Becker muscular dystrophy. *NMR in biomedicine*, 27(11):1371–1377.

Wright DJM, Archard LC, Partridge T. 1993. *Molecular and Cell Biology of Muscular Dystrophy*. Dordrecht: Springer Netherlands.

9. Anhang

9. 1. Abkürzungsverzeichnis

←ACE→	zytoskelettale Elemente
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
43 K	43 Kildodalton-Protein
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting Enzym
AChR	Acetylcholinrezeptor
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMD	Becker-Muskeldystrophie
bp	Basenpaare
CC	Coiled-Coils
CK	Creatinkinase
c-M	männliche Kontrollprobe
c-W	weibliche Kontrollprobe
DAPC	Dystrophin-assoziiierter Proteinkomplex
DMD	Duchenne-Muskeldystrophie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRP	Dystrophin-bezogene Proteine
DYS	Dystrophin
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F	Forward Primersequenz
ⓕ	eingelagertes Fettgewebe
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
Grb2	Growth factor receptor-bound Protein 2

HIER	heat induced epitop retrieval
IC DAP	intrazelluläre Anteile des Dystrophin-assozierten Proteinkomplexes
kb	Kilo-Basenpaare
kbl	Kilobasen-Leiter
kDa	Kilodalton
Mb	Mega-Basenpaare
MF	hyalinschollige Muskelfaserdegeneration
ml	Milliliter
MLPA	multiplex ligation-dependent probe
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
ntc	Negativkontrolle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
R	Reverse Primersequenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
SRY	geschlechtsbestimmende Region des Y-Chromosoms
SS	Sarcospan
Syn	Syntropin
TM DAP	transmembranöse Anteile des Dystrophin-assozierten Proteinkomplexes
ZFX	Zink-Finger-Gen
α DB	α -Dystrobrevin
α DG	α -Dystroglykan
β DG	β -Dystroglykan

9. 2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Funktionelle Karte des Dystrophin-Gens (aus Koenig et al. 1989).....	4
Abb. 2: Aufbau des DAPC (aus Blake et al. 2002)	6
Abb. 3: Auftreten von Dystrophin und Utrophin im Muskel von BMD-Patienten (aus Kawanri et al. 1996)	8
Abb. 4: Zytoskelettale Veränderungen führen zu einem Kalziumeinstrom über die Fehlregulation von Acetylcholinrezeptoren (aus Carlson 1998).....	14
Abb. 5: Histologische Präparate des <i>Musculus rectus abdominis</i> (aus Horiuchi et al. 2014) ..	21
Abb. 6: Immunfluoreszenzfärbung des Dystrophins (aus Horiuchi et al. 2014)	21
Abb. 7: Verändertes Muskelfleisch der beiden steirischen Schlachtschweine.....	23
Abb. 8: Fragebogen zur Erhebung des Auftretens von Veränderungen welcher der fettigen Muskeldystrophie entsprechen.	30
Abb. 9: Anhang der E-Mail zur Umfrage: Kurze Erklärung des Krankheitsbildes mit Bildern des betroffenen Schlachtkörpers aus der Steiermark.....	31
Abb. 10: Histologisches Bild der Skelettmuskulatur eines von der fettigen Muskeldystrophie betroffenen Schlachtkörpers aus der Steiermark	33

Abb. 11: Immunhistochemisch gefärbtes histologische Präparat der Skelettmuskulatur eines betroffenen Schlachtkörpers mit sichtbarer Reduktion der Anfärbbarkeit von Dystrophin.....	34
Abb. 12: Ergebnis der Gel-Elektrophorese.....	35
Abb. 13: Fettinfiltration der Muskulatur eines Schlachtkörpers aus Oberösterreich	37