

Het gebruik van non-random X-inactivatie bij kwantitatief Dystrofine onderzoek

J.E. Ras, A. Aartsma-Rus, J.T. den Dunnen, D. Lindhout

Neem voor vragen, opmerkingen etc. contact op met:

Janneke Ras j.e.ras@students.uu.nl

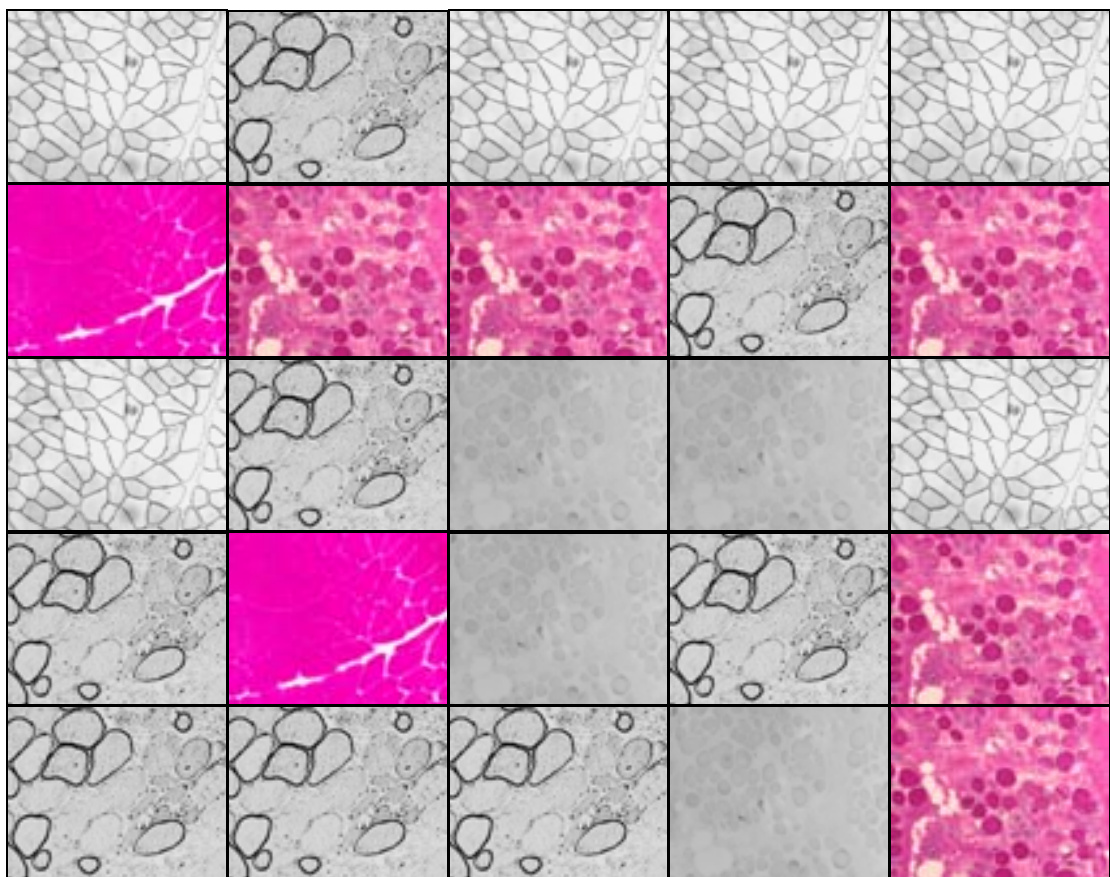
of

Annemieke Aartsma-Rus a.m.rus@lumc.nl

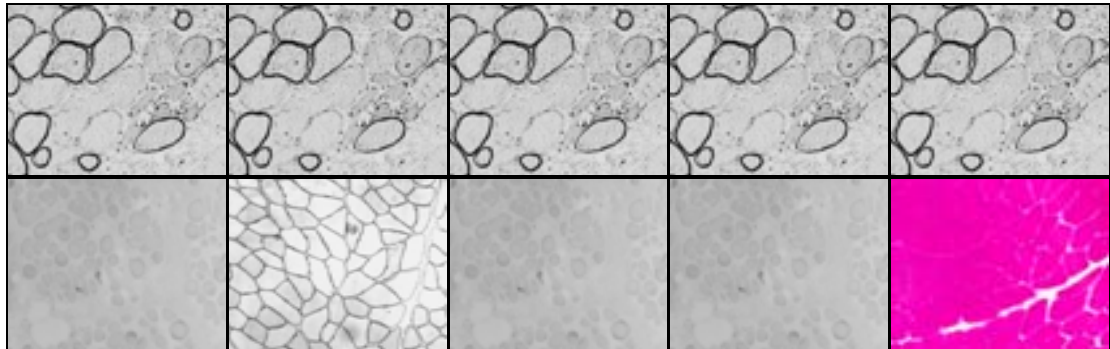
When referring to this document please refer to the following url:

Als u dit document wilt citeren, dient u de volgende url te gebruiken:

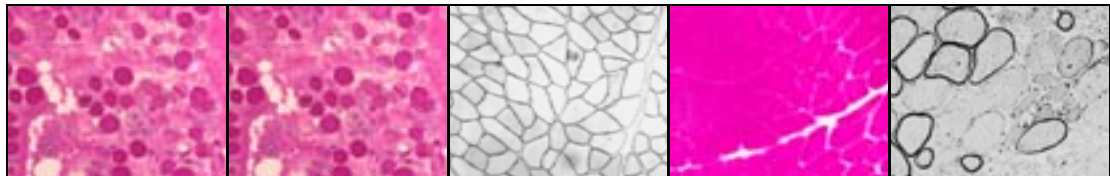
<http://www.dmd.nl/X-inactivatie>



Het gebruik van non-random X-inactivatie bij kwantitatief Dystrofine onderzoek



J.E. Ras, A. Aartsma-Rus, J.T. den Dunnen, D. Lindhout



Het gebruik van non-random X-inactivatie bij kwantitatief Dystrofine onderzoek

Het gebruik van non-random X-inactivatie bij kwantitatief Dystrofie onderzoek

J.E. Ras, studente geneeskunde UMC Utrecht

A. Aartsma-Rus, universitair docent Humane Genetica Leiden UMC

J.T. den Dunnen, universitair hoofddocent Humane Genetica Leiden UMC

D. Lindhout, hoogleraar Medische Genetica UMC Utrecht

Vanwege mijn belangstelling in behandelingsmogelijkheden voor Duchenne spierdystrofie alsmede mijn interesse in de kindergeneeskunde,
Janneke Ras

7 april 2008

Inhoud

Introductie	p.6
X-inactivatie	p.6
<i>Regulatie van random inactivatie</i>	p.7
<i>Oorzaken van non-random inactivatie</i>	p.9
X-inactivatie bij muizen en mensen	p.11
<i>Muismodellen voor X-inactivatie</i>	p.12
Duchenne spierdystrofie	p.13
<i>Muismodellen voor Duchenne spierdystrofie</i>	p.15
De bepaling van de benodigde hoeveelheid dystrofine	p.17
<i>Muismodel voor bepaling van de benodigde hoeveelheid dystrofine</i>	p.18
Conclusie	p.19

Introductie

Duchenne spierdystrofie (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD) is een van de meest voorkomende letale erfelijke ziekten van de kindertijd. Deze ziekte komt voor bij ongeveer een op 3500 levendgeboren jongens en wordt veroorzaakt door mutaties van het *DMD* gen. Dit gen codeert voor het eiwit dystrofine en is gelegen op de korte arm van de X chromosoom. Op het moment is er veel onderzoek naar gen- en genetische therapieën voor DMD. Hiervoor is het onder andere belangrijk te weten hoeveel dystrofine nodig is om de progressieve spierzwakte die kenmerkend is voor Duchenne tegen te gaan en/of om verbetering in spierfunctie te geven.

In deze scriptie wil ik nagaan of het mogelijk is om non-random X-inactivatie bij muismodellen te gebruiken om te bepalen hoeveel dystrofine er nodig is voor een therapeutisch effect bij de behandeling van Duchenne spierdystrofie.

X-inactivatie

X chromosoom inactivatie (XCI) is het fenomeen in vroege vrouwelijk embryo cellen waarbij één van de twee X chromosomen random transcriptioneel stilgelegd wordt. Deze keus wordt overgeërfd in alle dochtercellen¹. Het menselijke Y chromosoom bevat slechts een beperkt aantal genen. Deze genen zijn betrokken in bepaling van het geslacht en spermatogenese of hebben X gelinkte homologen². Het X chromosoom draagt echter bij tot ongeveer 5% van het menselijke genoom³. Door XCI is er dosis compensatie tussen vrouwen (XX) en mannen (XY).

Nadat XCI compleet is, wordt de heterochrome geïnactiveerde staat van de inactieve X overgeërfd via mitose⁴ en gehandhaafd, hoewel sommige loci reacteren naarmate een hogere leeftijd bereikt wordt^{5,6}. Desondanks is XCI over het algemeen erg stabiel⁷.

X-inactivatie staat onder controle van het X-inactivatie center (*Xic*). Het *Xic* reguleert het tellen van het aantal X chromosomen en bevat het niet coderende *Xist* RNA gen. Een gevolg van deze regulerende werking is dat XCI alleen plaats vindt indien meerdere X chromosomen aanwezig zijn. Tevens zorgt het ervoor dat maar één X chromosoom actief blijft. Zo zal bijvoorbeeld bij personen met het syndroom van Klinefelter (XXY) één van de X chromosomen geïnactiveerd worden en bij personen met het triple-X syndroom (XXX) twee van de X chromosomen worden geïnactiveerd

XCI start met de ophoping van *Xist* langs de toekomstige inactieve X. Dit is het gevolg van geslacht-specifieke inductie van *Xist* transcriptie op de toekomstige inactieve X⁸. In de vroege stadia wordt *Xist* expressie gereguleerd door het *Tsix* gen. *Tsix* is een lang, niet coderend RNA, welke voornamelijk in de kern werkzaam is en in tegengestelde richting afgelezen wordt over het *Xist* gen. *Tsix* heeft het *DXPas34* element nodig voor zijn functie⁹. Deletie van dit element geeft niet-random XCI van de gemuteerde X en een defect in ingeprinte XCI¹⁰. In gedifferentieerde cellen wordt *Xist* onderdrukking op het actieve X chromosoom gemedieerd via DNA methylatie.

DNA methylatie vindt plaats via verschillende stappen. Zoals gezegd speelt het *Xist* een rol bij de eerste fasen. *Xist* RNA hoopt zich op op de toekomstige inactieve X. Zo ontstaat een kern compartiment dat niet afgeschreven kan worden. Polycomb complexen worden vervolgens gerekruteerd naar het *Xist* bedekte chromosoom en zorgen voor histone modificaties over het gehele chromosoom.

De inactieve X is niet geheel inactief: ongeveer 15% van de genen ontsnapt XCI en komen tot expressie op beide chromosomen. Welke genen ontsnappen en welke stilgelegd worden is individueel verschillend¹¹. De meeste van de genen die ontsnappen liggen op de korte arm van het X chromosoom.

Welk chromosoom actief en welke geïnactiveerd wordt, is random bepaald. Paring van *Xic* loci op beide chromosomen en wisselende stadia van het X chromosoom voor de inactivatie hebben mogelijk een rol in het mechanisme van de random keuze.

Regulatie van random inactivatie

Hoe random X-inactivatie precies tot stand komt is onduidelijk tot op heden. Hoogst waarschijnlijk zijn vele regulatoire systemen betrokken bij de initiatie van XCI met tellen en keuze. Er zijn enkele hypothesen over de totstandkoming van XCI.

Mogelijk bestaat er een autosomale blokfactor welke een X chromosoom tegen inactivatie beschermd (fig 1a). Een mogelijk element hiervoor is het eerder genoemde *DXPas34*, welke een locatie 3' van *Xist* heeft¹². *DXPas34* bevat vele *CTCF* en *YY1* bindingsplaatsen welke nodig zouden kunnen zijn voor structurele rollen voor *Xic* regulatie of kunnen werken als blokfactor¹³.

Gebaseerd op het blokfactor model is een symmetriebrekend model ontstaan waarin vele oplosbare moleculen kwantitatief verspreid worden op Xa door moleculaire interacties¹ (fig 1b). Door clustering van deze moleculen ontstaat een complex welke het chromosoom beschermd tegen inactivatie. De nabijheid van de *Xic* loci zou ervoor zorgen dat een bindingsevenwicht snel genoeg ontstaat om zo onderscheid te maken tussen een actief geblokkeerd en een inactief niet geblokkeerd X chromosoom.

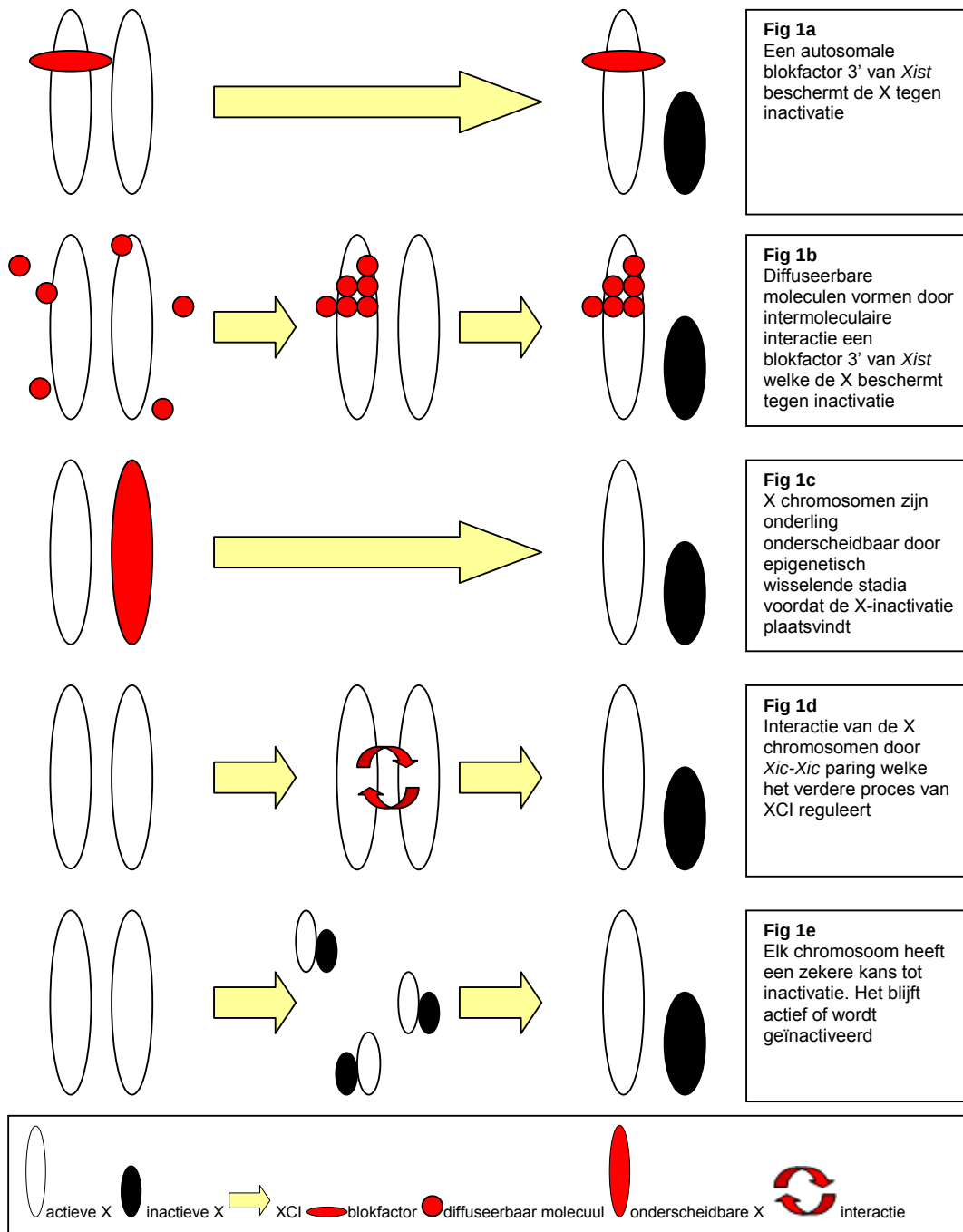
X chromosomen zouden onderscheidbaar kunnen zijn voor inactivatie door het aannemen van wisselende stadia (fig 1c). Cohesie van zuster chromatiden is verschillend gereguleerd tussen twee vrouwelijke X chromosomen¹⁴. Er zou een inherent verschil kunnen zijn tussen twee genetisch identieke chromosomen in minstens een deel van de celpopulatie. De stadia zouden kunnen resulteren in verschil tussen blokfactor binding of *Xic* transcriptie.

Communicatie over en weer van X chromosomen via *Xic-Xic* paring is waargenomen^{15,16}. Hier komt een model uit voort waarin regulatie van XCI door communicatie van de *Xics* bestaat¹⁷ (fig 1d). *Xic* communicatie zou hierbij het binden van een blokfactor kunnen stimuleren.

Elk mechanisme van XCI tellen en keuze heeft een stochastisch element. Het zou mogelijk kunnen zijn dat een X chromosoom simpelweg geïnactiveerd wordt door een zekere waarschijnlijkheid zodat het X chromosoom geïnactiveerd wordt ofwel actief blijft (fig 1e).

Tot op heden zijn de moleculaire eigenschappen van de factoren betrokken bij het telproces onbekend. Naast een autosomale blokfactor zou een X gelinkte competentie factor kunnen bestaan¹². De moleculaire basis is complex en het is moeilijk om de modellen te onderscheiden als er geen analyse kan bestaan van de moleculaire componenten. Het blokfactor model lijkt aannemelijk mede doordat het methyl-DNA bindende eiwit *Mbd2* zorgt voor *Xist* repressie¹⁸. Verder is het bij muizen zo dat mutaties op chromosoom 15, 10 en 5, genoemd de X-inactivatie autosomale factoren *Xiaf1*, *Xiaf2* en *Xiaf3*⁴¹ het verwachte inactivatie patroon verstoren zonder verdere verstoring te geven van het X chromosoom. De hypothese hierbij is dat de mutatie een autosomale blokfactor betreft.

Fig 1: mechanismen van random X-inactivatie



Oorzaken van non-random inactivatie

Zoals gezegd vindt XCI in het algemeen random plaats vroeg tijdens de embryogenese. De stabiele handhaving door de celdelingen resulteert in vrouwen welke mozaïek zijn voor populaties van cellen met het vaderlijke of het moederlijk X chromosoom actief. Dit omdat XCI gebeurt op verschillende tijdstippen in voorlopercellen van verschillende weefseltypen¹⁹.

Er zijn meerdere mechanismen bekend welke resulteren in afwijkingen van de random inactivatie.

In muizen vindt primaire niet-random inactivatie plaats in extra-embryonisch weefsel waar de vaderlijke X altijd geïnactiveerd wordt^{3,20}. Bij mensen is in het algemeen geen inprinting, er zijn echter gevallen bekend van niet-random inactivatie in trofoblastisch extraembryonaal weefsel²¹ (= in de buitenste laag van de blastula welke zorgt voor innesteling in het baarmoederslijmvlies).

Niet-random inactivatie kan het resultaat zijn van mutaties in genen welke betrokken zijn bij X-inactivatie, zoals mutaties in *Xist* of het antisense *Tsix*²².

Verdrongen inactivatie kan ook het gevolg van selectie zijn (zie fig 2). De mate van de selectiedruk is gerelateerd aan het belang en de cellulaire lokalisatie van het genproduct, het type mutatie en of het gen ontsnapt van de inactivatie³. Extensieve chromosomale rearrangements lijden tot selectie voor de minste verstoring in gendosage. Zo worden X chromosomen met grote deleties met voorkeur geïnactiveerd (fig 2a), terwijl bij een gebalanceerde translocatie in het algemeen de normale X geïnactiveerd wordt (fig 2b)²³. In X-chromosomale aneuploidieën zorgt een telmechanisme ervoor dat slechts een enkel X chromosoom actief is (fig 2c). In vrouwen met chromosoomafwijkingen waarbij een van de chromosomen is aangedaan zal het normale X chromosoom de actieve worden (fig 2d).

Daarnaast wordt natuurlijke verhoogde verdringing van X-inactivatie gezien in perifere bloedcellen bij oudere vrouwen. De oorzaak hiervan is nog niet geheel duidelijk (fig 3). Selectie zou de oorzaak kunnen zijn van de verhoogde verdringing met de leeftijd door een selectie proces tegen of voor een actief X chromosoom welke een of enkele bepaalde gen(en) draagt²⁴ (fig 3a). Dit zou het geval kunnen zijn bij een mutatie in een gen welke betrokken is bij de handhaving van inactief stadium.

Fig 2: het telmechanisme en non-random inactivatie door selectie

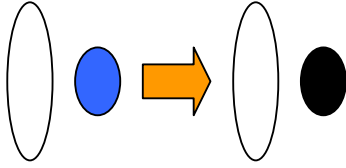


Fig 2a: gemuteerde X met grote deletie wordt non-random geïnactiveerd

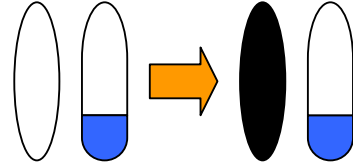


Fig 2b: gemuteerde X met gebalanceerde translocatie blijft actief na non-random inactivatie

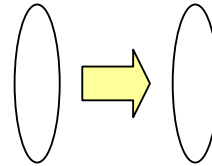
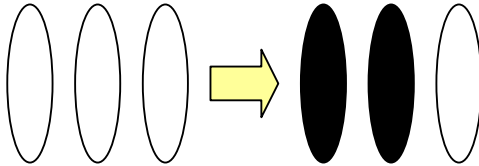


Fig 2c: aneuploidien, een telmechanisme bij XCI zorgt ervoor dat een X actief blijft

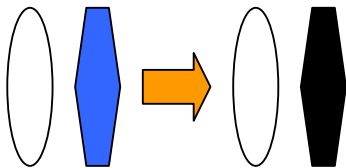
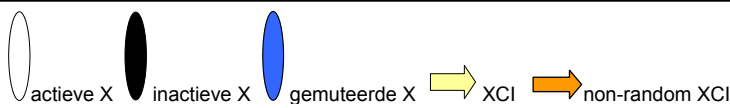


Fig 2d: gemuteerde X met structurele abnormaliteit wordt inactief na non-random inactivatie



Elk proces welke een vermindering in het aantal precursor cellen geeft kan lijden tot een grotere waarschijnlijkheid van ogenschijnlijke verdrongen X-inactivatie. Dit zou het geval kunnen zijn bij tweelingen hoewel bij zelfs een erg grote reductie in de embryo precursor pool een extreme verdringing slechts zelden gezien wordt²⁵. Verdringing wordt vaker gezien bij de aanwezigheid van trisomie mozaïcisme waarbij de trisomische lijn zich voornamelijk in de placenta bevindt^{26,27}.

Depletie van de stamcelpool over de tijd zou tevens een oorzaak van de verhoogde verdringing in het bloed met de leeftijd kunnen zijn²⁸. Hierbij wordt aangenomen dat ofwel het maternale ofwel het paternale X chromosoom een voordeel heeft boven de andere waarbij deze vaker verloren gaat indien deze actief aanwezig is (fig 3b).

Afwijkingen van de random inactivatie kunnen lijden tot de expressie van recessieve aandoeningen in heterozygote vrouwen. Verdrongen X-inactivatie is zo gerelateerd aan een aangedaan fenotype bij draagsters van bepaalde X-gelinkte ziekten zoals haemofilie, Duchenne spierdystrofie, myotubulaire myopathie en de ziekte van Fabry²⁹. Het wordt ook gezien in draagsters met X-gelinkte mentale retardatie. Een hogere frequentie van verdrongen inactivatie

wordt gezien bij patiënten met invasief ovarium kanker en borstkanker bij jonge vrouwen^{30,31,32}. De verdrongen XCI in het bloed met de leeftijd zou mogelijk ook de consequentie kunnen zijn van de manifestatie van X-gebonden ziekten bij oudere vrouwen. Hierbij valt bijvoorbeeld te denken aan late-onset manifestaties van X-gebonden sideroblastische anemie³³ en glucose-6-fosfaat dehydrogenase deficiency³⁴.

Fig 3: mogelijke oorzaken van de verhoogde verdringing in perifere bloedcellen bij oudere vrouwen

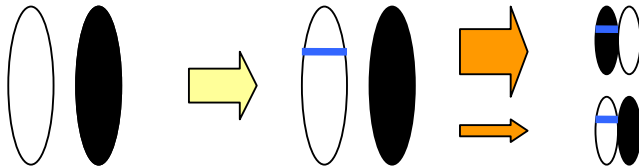


Fig 3a: een verworven mutatie zorgt ervoor dat verdringing van X-inactivatie plaatsvindt door selectie ten nadele van de actieve gemuteerde X

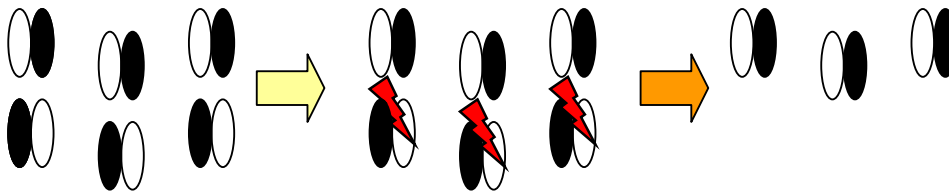
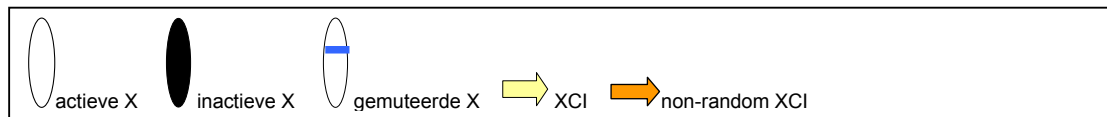


Fig 3b: door depletie van de stamcel pool over de tijd doordat een bepaald actief X chromosoom (met voorkeur) vaker verloren gaat ontstaat een verschuiving van random (50/50) situatie



X-inactivatie bij muizen en mensen

De eerste hypothese over XCI is ontstaan bij muizen³⁵. Sindsdien is de muis een veel gebruikt model voor het bestuderen van X-inactivatie hoewel er meerdere verschillen bestaan tussen inactivatie bij mens en muis.

Het lijkt zo te zijn dat bij muizen minder genen inactivatie ontsnappen dan bij mensen. Dit komt overeen met de ontwikkeling van het Turner syndroom bij een vrouw die een geslachtschromosoom mist in contrast tot een normaal fenotype bij de chromosomaal vergelijkbare muis³⁶. Het verschil zou kunnen ontstaan doordat de genen die bij de vrouw normaliter nog tot expressie komen van de geïnactiveerde X essentieel zijn terwijl dit bij de muis niet het geval is. Hierbij zouden dan de missende genen van de inactieve X bij de vrouw zorgen voor een afwijkend fenotype.

Zoals al eerder gezegd is er variëteit tussen het imprinten van inactivatie. Bij muizen is er voorkeur van vaderlijke X-inactivatie in extraembryonaal weefsel³⁷. Bij mensen zijn er enkele gevallen bekend van inprinting in (trofoblastisch) extraembryonaal weefsel maar is dit in het algemeen niet het geval³⁸. De extraembryonale weefsels zijn de eerste die inactivatie ondergaan bij muizen, de imprinting gaat verloren tegen

de tijd dat de somatische weefsels inactivatie ondergaan³⁹. De afwezigheid van inprinting bij mensen zou een gevolg kunnen zijn van een vertraging in het tijdstip van inactivatie tot het moment dat het inprinting verlies al geweest is. Het zou ook veroorzaakt kunnen worden door verschillen tussen de initiële gebeurtenissen van inactivatie.

Vrouwelijke embryonale stencellen van muizen ondergaan inactivatie tijdens in vitro differentiatie. Manipulatie van deze cellen door transgene insertie en homologe gen targeting, gecombineerd met de mogelijkheid tot reconstitutie maakt het mogelijk in vivo studies bij muizen als modelsysteem te gebruiken.

Muismodellen voor X-inactivatie

Het X-controlling element (*Xce*) reguleert bij muizen X chromosoom keuze via verschillende allelen⁴⁰. De vier allelen, *Xce^a*, *Xce^b*, *Xce^c*, *Xce^d* vergroten de waarschijnlijkheid dat een X chromosoom actief blijft. Het *Xce* geeft niet random X-inactivatie bij *Xce* heterozygote vrouwtjes maar random inactivatie bij *Xce* homozygote vrouwtjes⁴¹. Hierbij bestaat een hypothese van een blokfactor welke het sterkste *Xce* allel bindt (zie fig 4). Hierbij zijn *Xce^a* en *Xce^b* zwakkere allelen dan *Xce^c* en *Xce^d*.

Fig 4: model van *Xce* gereguleerde inactivatie

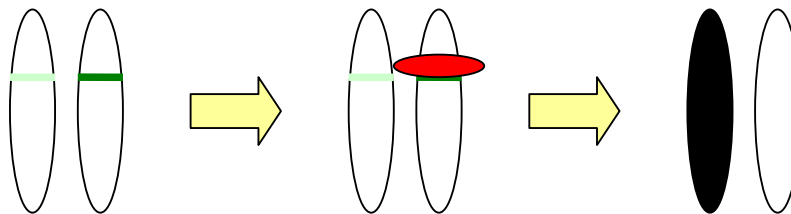


Fig 4a: niet random inactivatie door het binden van een blokfactor op het sterkste *Xce* allel

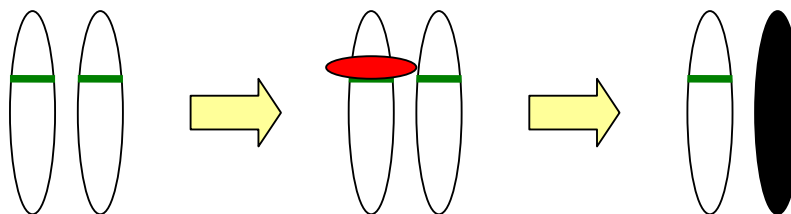
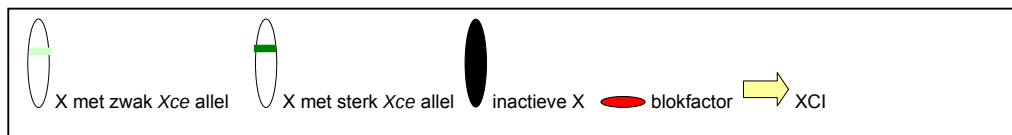


Fig 4b: random inactivatie door het binden van een blokfactor op een van beide *Xce* allelen



Er zijn verschillende muismodellen mogelijk waarbij mutaties leiden tot een selectieve X-inactivatie (tabel 1). Deze mutaties betreffen de regulerende allelen *Xist*⁴², *Xite*⁴³, *Tsix*⁴⁴ of *DXPas34*⁴⁵. Indien een van deze allelen gemuteerd is zal dit afwijkingen van random inactivatie geven met een patroon van ongeveer 80:20 tot 90:10.

Tabel 1: overzicht muismodellen met mutatie voor non-random XCI

Deletie	Inactivatie
<i>Xist</i>	Wild type allel
<i>Xist</i> promotor	Gemuteerd allel
<i>Xite</i>	Gemuteerd allel
<i>Tsix</i>	Gemuteerd allel
<i>DXPas34</i>	Gemuteerd allel

Duchenne spierdystrofie

Duchenne spierdystrofie is een X gebonden recessieve ziekte met een gebrek aan functioneel dystrofine. Voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën is het van belang om te weten hoeveel genproduct noodzakelijk is voor een therapeutisch effect. Om dit te onderzoeken kun je theoretisch denken aan het gebruik van X-inactivatie.

De primaire oorzaak van deze ziekte is een mutatie in het *DMD* gen dat codeert voor dystrofine, wat essentieel is voor de structuur en functie van spieren⁴⁶. Daarnaast worden meerdere andere kortere iso-vormen van dystrofine worden ook afgeschreven van het *DMD* gen via verschillend promotor gebruik. De promotoren produceren eiwit iso-vormen van 260, 140, 116 en 71 kDa (*Dp260*, *Dp140*, *Dp116*, *Dp71*)⁵²⁻⁵⁵. Deze iso-vormen komen in verschillende weefsels tot expressie. Zo komt *Dp 260* vooral in de retina tot expressie⁴⁷. *Dp140* is gelokaliseerd in de hersenen en nieren^{48,49}. *Dp116* in Schwann cellen⁵⁰. *Dp71* komt tot expressie in bijna alle weefsels behalve skeletspieren⁵¹.

Het dystrofine eiwit interacteert met meerdere onderdelen van het dystrophin glycoprotein complex (DGC). Het DGC is een groot complex van membraan-geassocieerde eiwitten. Dit complex bestaat uit dystrofine, dystroglycanen, sacroglycanen, sarcospan, syntrofinen en α dystrobrevine. Het functioneert als een mechanisch alswel signalerende link tussen de extracellulaire matrix en het cytoskelet⁵². Er is een groeiend aantal eiwitten welke geassocieerd zijn met het DGC in de spiercel zoals nNOS en laminine-2.

Mutaties in het dystrofine eiwit resulteren in membraan schade met infiltratie van immuuncellen met chronische inflammatie, necrose en ernstige spierdegeneratie (zie fig 5)^{53,54}. Doordat dit in al het spierweefsel van het lichaam plaats zal vinden ontstaat het beeld van progressieve spierdystrofie. Regeneratie vindt maar zeer beperkt plaats.

Fig 5: Spiervezels van een gezond individu en DMD patiënt



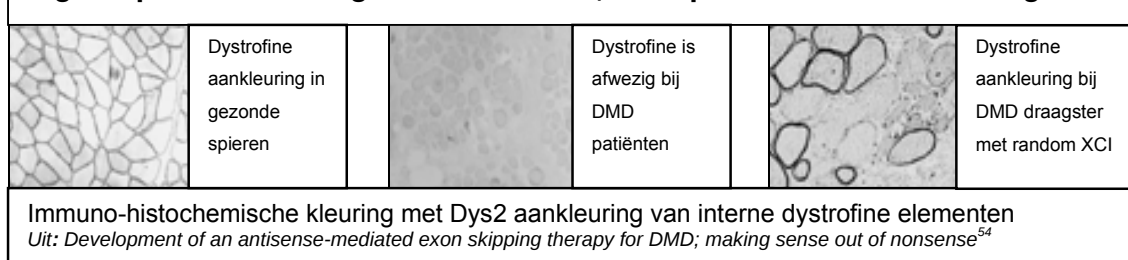
DMD kinderen tonen vroeg symptomen van spierdegeneratie, ontwikkelen vaak contracturen en verliezen de mogelijkheid om te lopen tussen een leeftijd van zes en twaalf jaar. Een meisje is normaliter niet aangedaan door de ziekte. Dit omdat het een recessieve X gebonden ziekte is en een vrouwelijke draagster in geval van random inactivatie dystrofine productie heeft tot hoeveelheden van ongeveer 50% van normaal (zie fig 6). Tevens zou het mogelijk kunnen zijn dat een regulatie mechanisme ter compensatie van de dystrofine hoeveelheden aanwezig is waardoor een draagster verhoogde eiwitproductie vertoont zodat normale hoeveelheden dystrofine geproduceerd worden. Toch hebben sommige vrouwen manifestaties van de ziekte (zie fig 7)⁵⁴. Manifesterende draagsters vertonen niet random inactivatie in het bloed⁵⁵.

De meeste patiënten overleden voorheen rond de leeftijd van twintig jaar door respiratoir falen of hartproblemen. Door symptoombehandeling met corticosteroïden tegen de ontsteking, thuisbeademing voor het respiratoir falen en ACEremmers ter verlaging van de cardiale pre- en afterload is de levensverwachting toegenomen met tien tot twintig jaar, er zijn op dit moment patiënten die de leeftijd van veertig overschreden hebben. Mogelijk valt nog meer winst te behalen met de ontwikkeling van therapieën op genetisch niveau. Hierbij zal het produceren van functioneel dystrofine in DMD patiënten een doel zijn. Onbekend is hoeveel dystrofine er nodig is voor normale spierstructuur en functie.

Fig 6: Dystrofine productie

XX or XY	Normale dystrofine productie
X*Y	Afwezige dystrofine productie
X*X	Ongeveer 50% dystrofine productie
Verdrongen XCI > X*X	Ongeveer 5-40% dystrofine productie
*Mutant DMD gen	

Fig 7: Spiervezels van gezonde individu, DMD patiënt en random draagster



Muismodellen voor Duchenne spierdystrofie

Om na te gaan of non-random X-inactivatie bij muismodellen te gebruiken is om te bepalen hoeveel dystrofine er nodig is voor effect bij de behandeling van DMD wil ik hieronder eerst een overzicht geven van de bestaande muismodellen voor DMD.

Mutaties in het DGC verstoren het complex en leiden tot spierdystrofie. Er zijn een paar natuurlijk voorkomende modellen van DGC geassocieerde spierziekten. Zo is er de dystrofine deficiënte *mdx*-muis voor DMD. Dit model komt echter slechts gedeeltelijk overeen met de menselijke ziekte. Aanvullend zijn meerdere andere DMD muismodellen ontwikkeld voor dystrofine en andere onderdelen van het DGC als wel voor het gehele DMD gen (zie voor overzicht tabel 2).

Dystrofine

De *mdx* (X chromosome linked muscular dystrophy) muis mist dystrofine als resultaat van een puntmutatie in exon 23 of het dystrofine gen⁵⁶. Hoewel dit model een waardevol model voor DMD is, is de progressieve spierzwakte milder dan bij mensen in de meeste spieren⁵⁷. The *mdx* muis toont tekenen van spierdystrofie maar weinig zwakte en een haast normale levensduur. Alleen het diafragma is bij deze muis ernstig aangedaan.

De *mdx* muis past zich aan op de spierdegeneratie met een uitbreiding van de satellietcellen en spierhypertrofie. Transcriptie factoren lijken belangrijk te zijn voor deze regeneratie. Muizen zonder spier specifieke transcriptie factor *MyoD* (*MyoD/Mdx*) tonen een deficiëntie in regeneratie met ernstigere spierdystrofie⁵⁸. Muizen deficiënt in myocyt nuclear factor *Mnf* (*Mnf/Mdx*), welke selectief tot uiting komt in satelliet cellen, tonen een exacerberend dystrofisch fenotype door verlies van satelliet cel functie⁵⁹.

Een andere mogelijke verklaring voor het milde fenotype van de *mdx* muis is dat het homologe eiwit utrofine compenseert voor het gebrek aan dystrofine. Muizen met gebrek aan zowel dystrofine als utrofine (*utrn*^{-/-}/*mdx*) tonen vele tekenen van DMD bij mensen⁶⁰. Zo vertonen ze ernstige progressieve spierdystrofie welke resulteert in een vroegtijdige dood. Tevens bestaat een heterozygote utrofine dystrofine muis (*utrn*^{+/-}/*mdx*), deze vertoont tevens een vrij goed gelijkend beeld van DMD bij mensen maar leeft langer in vergelijking met de homozygote utrofine deficiënte muis⁶¹.

De *Mdx*^{2CV-5CV} muizen zijn gegenereerd door het gebruik van chemische mutatie met N-ethyl nitrosurea⁶². Hierdoor komen bepaalde dystrofine iso-vormen niet meer tot expressie. Zo heeft de *Mdx*^{3V} een deficiëntie van de kortere vormen door mutatie aan het 3' eind van het dystrofine gen. Afwezigheid van alle dystrofine isovormen en utrofine (*Utrn*^{-/-}/*Mdx*^{3CV}) verslechtert het fenotype niet in vergelijking met de *utrn*^{-/-}/*mdx* muis⁶³. Muizen met gerichte *Dp71* inactivatie (*Dp71*^{-/-}) vertonen geen duidelijk fenotype⁶⁴.

Door insertie van de *ROSAβgeo* vector aan het 3' eind van het DMD gen is een muismodel (*Dmd*^{*mdx-βgeo*}) ontwikkeld welke vergelijkbaar is met de *Mdx*^{3V} muis.

De mutatie betreft alle bekende dystrofine isovormen. Door kleuring van β -galactosidase activiteit ontstaat een model voor dystrofine expressie⁶⁵.

Er is tevens een dystrofine gen knock-out muis (*Mdx52*) geproduceerd door deletie van exon 52 van dystrofine. Deze muis heeft een vergelijkbaar fenotype met de *mdx* muis⁶⁶.

Dystrobrevine

Mutaties van meerdere DGC componenten lijken spierdystrofie te veroorzaken. Zo ontwikkelen muizen deficiënt in α -dystrobrevine (*Abdn*^{-/-}) een milde dystrofie⁶⁷.

DMD gen

Er zijn tevens muis modellen gegenereerd door deletie van het gehele *DMD* gen. Een is de *DMD floxed* muis waarin de gehele regio van het *DMD* gen geflankeerd wordt door twee *loxP* sites en expressie in de hersenen tegelijk wordt geïnactiveerd. In de *DMD floxed* muis is de full-length dystrofine expressie in de hersenen geïnactiveerd maar is er geen effect op de andere isovormen⁶⁷. Een ander model is de *DMD null* muis waarbij het *DMD* gen geheel verwijderd is. De *DMD null* mouse heeft geen enkele expressie van zowel full-length als kortere vormen van dystrofine⁶⁸.

In aanvulling is er een muismodel voor DMD gemaakt met een geïntegreerde en functionele kopie van het volledige menselijke *DMD* gen (*hDMD*). Dit is gedaan door fusie van een gist met daarin het volledige humane gen met een embryonale stamcel van een muis⁶⁹.

Tabel 2: overzicht muismodellen voor Duchenne spierdystrofie

Genotype	referentie	Levensduur	Skelet dystrofie	Cardiomyopathie
<i>Mdx</i>	56,57	> 1 jaar	+/++	+
<i>Mdx</i> ^{2CV} (<i>Dp 260</i>)	62	> 1 jaar	+/++	+
<i>Mdx</i> ^{3CV} (<i>Dp71,116,140,260</i>)	62	> 1 jaar	+/++	+
<i>Mdx</i> ^{4CV} (<i>Dp140, 260</i>)	62	> 1 jaar	+/++	+
<i>Mdx</i> ^{5CV}	62	> 1 jaar	+/++	+
<i>Dmd</i> ^{<i>mdx-βgeo</i>}	65	> 1 jaar	+/++	+
<i>Mdx52</i>	66	> 1 jaar	+/++	-
<i>Dp71</i> ^{-/-}	64	> 6 maanden	-	-
<i>Mnf/mdx</i>	59	~ 3 weken	+++	?
<i>MyoD/Mdx</i>	58	> 1 jaar	+++	+++
<i>Utrn</i> ^{-/-}	60	>1 jaar	-	-
<i>Utrn</i> ^{+/-} / <i>Mdx</i>	60	4-20 weken	+++	+++
<i>Utrn</i> ^{+/-} / <i>Mdx</i>	61	> 1 jaar	++	++
<i>Utrn</i> ^{-/-} / <i>Mdx</i> ^{3CV}	63	4-20 weken	+++	+++
<i>Adbn</i> ^{-/-}	67	> 1 jaar	+	+
<i>Adbn</i> ^{-/-} / <i>Mdx</i>	67	> 8 – 10 maanden	++	++
<i>Adbn</i> ^{-/-} / <i>Mdx</i> / <i>Adbn</i>	67	> 3 -11 weken	+++	+++
<i>DMD</i> ^{floxed}	68	> 1 jaar	-	-
<i>DMD</i> ^{null}	68	> 1 jaar	+/++	+
<i>hDMD</i>	69	> 1 jaar	-	-

De bepaling van de benodigde hoeveelheid dystrofine

Een mutatie van het *DMD* gen lijkt geen invloed te hebben op de wijze van X-inactivatie. In het algemeen is het X-inactivatie patroon in de spier bij een *DMD* mutatie random (50:50). Een uitzondering hierop zijn de manifesterende vrouwen waar zowel patronen van hoge verdringing (90:10) als random patronen gezien worden. Hierbij is echter geen duidelijke relatie gevonden tussen de patronen en het gedeelte dystrofine negatieve spiervezels^{70,71}.

Een goede verklaring voor de onduidelijke relatie tussen fenotype en X-inactivatie patroon bij manifesterende draagsters is tot heden niet te geven. Dit komt mede door het gebrek aan goed onderzoek hierna. Zo is bijvoorbeeld niet gekeken naar het patroon van X-inactivatie in spiervezels welke verloren zijn gegaan en naar mogelijke variatie in het expressie patroon tussen verschillende spieren en longitudinaal in een spiervezel. Mogelijk spelen abnormaliteiten in de distributie van dystrofine alswel het totale expressie nivo een belangrijke rol in de ontwikkeling van myopathie.

Bij niet manifesterende draagsters lijkt het gedeelte rest dystrofine overeen te komen met de relatieve activatie in spieren van het X chromosoom welke het ongemuteerde allel bevat. Zo wordt bij immunohistochemische dystrofine evaluatie bij niet manifesterende dragster een mozaiek patroon gezien van dystrofine positieve en negatieve vezels, waarbij de laatste 15-30% uitmaken van alle vezels. Kwantitatieve evaluatie van dystrofine vertoonde een verlaagde hoeveelheid⁷². Aangenomen wordt dan ook dat 50% van de normale dystrofine hoeveelheid voldoende is om prominente spiervezel necrose en klinische symptomen te voorkomen. Therapieën welke zorgen voor een verhoging van de hoeveelheid functioneel dystrofine bieden dus mogelijk een uitkomst, mogelijk zelfs indien de hoeveelheid functioneel dystrofine ruim onder de normale waarden ligt.

Muismodel voor bepaling van de benodigde hoeveelheid dystrofine

Zoals eerder genoemd zijn er verschillen tussen X-inactivatie bij muizen en mensen. Zo is bekend dat bij muizen minder genen aan X-inactivatie ontsnappen en er imprinting van inactivatie is met voorkeur voor de vaderlijke X in extra-embryonaal weefsel. Ondanks deze verschillen is de muis een goed model voor het proces van X-inactivatie.

Bovenstaand overzicht van bestaande muismodellen toont dat er geen muismodel bestaat dat geheel overeenkomt qua genotype en fenotype met de menselijke ziekte DMD. Een gelijke mutatie lijkt zich anders te presenteren bij muizen. De modellen die de meeste fenotypische overeenkomsten vertonen zijn de muizen met naast een mutatie van het *DMD* gen een additionele mutatie in utrofine, α -dystrobrevine, MyoD of Mnf (de *Utrn*^{-/-}/*Mdx*, *Utrn*^{+/-}/*Mdx*, *Utrn*^{-/-}/*Mdx*^{3CV}, *Adbn*^{-/-}/*Mdx*, *Adbn*^{-/-}/*Mdx*/*Adbn*, *Mnf*/*mdx*, en *MyoD*/*Mdx* muizen). Om goed onderzoek te kunnen doen naar therapeutische effecten is een langere levensduur van de muizen wenselijk. Om deze reden heeft het gebruik van de fenotypisch lijkende *Utrn*^{+/-}/*Mdx* en *MyoD*/*Mdx* muizen de voorkeur.

Bruikbare modellen voor selectieve X-inactivatie zijn muizen met een mutatie in de *Xist*, *Xite*, *Tsix* of *DXPas34* allelen of door selectie van zwakke en sterke *Xce* allelen. Hierbij valt een verwacht non random patroon te verkrijgen van 80:20 tot 90:10.

Voor bepaling van de minimale hoeveelheid functioneel dystrofine waarbij geen klinische symptomen gezien worden, kan gebruik gemaakt worden van muismodellen van DMD waarbij selectieve inactivatie toegepast wordt. Zodoende kan een benadering van de nodige hoeveelheid worden gegeven. Hierbij dient de spierfunctie met de hoeveelheid dystrofine gecorreleerd te worden. Hieronder (tabel 3) zijn enkele mogelijkheden aangegeven voor het DMD muismodel *Utrn*^{+/-}/*Mdx*.

Tabel 3: mogelijkheden voor bepaling benodigde hoeveelheid

Muismodel (kruising)	Verwachte hoeveelheid dystrofine
<i>Utrn</i> ^{+/-} / <i>Mdx</i> x Δ <i>Xist</i>	1-30%
<i>Utrn</i> ^{+/-} / <i>Mdx</i> x Δ <i>Xist</i> promotor	1-30%
<i>Utrn</i> ^{+/-} / <i>Mdx</i> x Δ <i>Xite</i>	1-30%
<i>Utrn</i> ^{+/-} / <i>Mdx</i> x Δ <i>Tsix</i>	1-30%
<i>Utrn</i> ^{+/-} / <i>Mdx</i> x Δ <i>DXPas34</i>	1-30%
<i>Utrn</i> ^{+/-} / <i>Mdx</i> / <i>Xce</i> ^a x <i>Xce</i> ^d	1-30%
<i>Utrn</i> ^{+/-} / <i>Mdx</i> / <i>Xce</i> ^a x <i>Xce</i> ^c	5-40%
<i>Utrn</i> ^{+/-} / <i>Mdx</i> / <i>Xce</i> ^a x <i>Xce</i> ^b	10-50%
<i>Utrn</i> ^{+/-} / <i>Mdx</i> / <i>Xce</i> ^b x <i>Xce</i> ^d	5-40%
<i>Utrn</i> ^{+/-} / <i>Mdx</i> / <i>Xce</i> ^b x <i>Xce</i> ^c	10-50%
<i>Utrn</i> ^{+/-} / <i>Mdx</i> / <i>Xce</i> ^c x <i>Xce</i> ^d	10-50%

Bij deleties van *Xist*, de *Xist* promotor, *Xite*, *Tsix* en *DXPas34* wordt een X-inactivatie patroon gezien van 90:10-80:20^{73,74,75,76}. Gemiddeld is hierbij dus rond de 15% dystrofine aanwezig met wisselende deviaties van het gemiddelde.

Bij kruising tussen verschillende *Xce* allelen is het verschil in sterkte van het allel bepalend voor het patroon in X-inactivatie. Zo zal bij kruising tussen het zwakke *Xce*^a allel en het sterke *Xce*^d allel een patroon van rond de 20:80 ontstaan en bij kruising tussen *Xce*^a en *Xce*^c een patroon van omstreeks 25:75^{40,41}.

Conclusie

Voor de start van gen- en genetische therapieën bij de spierdystrofie van Duchenne is het van belang te weten hoeveel dystrofine nodig is om de progressieve spierzwakte tegen te gaan en/of om verbetering in spierfunctie te geven. Om deze hoeveelheid te bepalen kan gebruik worden gemaakt van non-random X-inactivatie op een DMD muismodel met evaluatie van spierfunctie en de hoeveelheid dystrofine.

-
- ¹ Nicodemi M, Prisco A. Symmetry-breaking model for X-chromosome inactivation. *Physical review letters* 2007: 98, 108104.
- ² Lahn BT, Page DC. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 1997: 278: 675-680.
- ³ Brown CJ, Robinson WP. The causes and consequences of random and non-random X chromosome inactivation in humans. *Clinical Genetics* 2000: 58: 353-363.
- ⁴ Davidson EH. Heritability and control of differentiated function in cultured cells. *J Gen Physiol* 1963: 46: 983-998.
- ⁵ Wareham KA, Lyon MF, Glenister PH, Williams ED. Age related reactivation of an X-linked gene. *Nature* 1987: 327 (6124): 725-727.
- ⁶ Migeon BR, Axelman J, Beggs AH. Effect of ageing on reactivation of the human X-linked gene. *Nature* 1988: 335 (6185): 93-96.
- ⁷ Migeon BR. X-chromosome inactivation: molecular mechanism and genetic consequences. *Trends Genet* 1994: 10: 230-235.
- ⁸ Sun BK, Deaton AM, Lee JT. A transient heterochromatic state in Xist preempts X inactivation choice without RNA stabilization. *Mol Cell* 2006: 21: 617-628.
- ⁹ Vigneau S, Augui S, Navarro P, Avner P, Clerc P. An essential role for the DXPas34 tandem repeat and Tsix transcription in the counting process of X chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006: 103: 7390-7395.
- ¹⁰ Cohen DE, Davidow LS, Erwin JA, Xu N, Warshawsky D, Lee JT. The DXPas34 repeat regulates random and imprinted X inactivation. *Dev Cell* 2007: 12: 57-71.
- ¹¹ Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 2005: 434 (7031): 400-404.
- ¹² Debrand E, Chureau C, Arnaud D, Ayner P, Heard E. Functional analysis of the DXPas34 locus, a 3' regulator of Xist expression. *Mol Cell Biol* 1999: 19: 8513-8525.
- ¹³ Donohoe ME, Zhang LF, Xu N, Shi Y, Lee JT. Identification of a Ctfc cofactor, Yy2, for the X chromosome binary switch. *Mol Cell* 2007: 25: 43-56.
- ¹⁴ Mlynarczyk-Evans S, Royce-Tolland M, Alexander MK, Andersen AA, Kalantry S, Gribnau J, Panning B. X chromosomes alternate between two states prior to random X-inactivation. *PLoS Biol* 2006: 4:e159.
- ¹⁵ Bacher CP, Guggiari M, Brors B, Augui S, Clerc P, Avner P, Eils R, Heard E. Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. *Nat Cell Biol* 2006: 8: 293-299.
- ¹⁶ Xu N, Tsai CL, Lee JT. Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. *Science* 2006: 311: 1149-1152.
- ¹⁷ Anguera MC, Sun BK, Xu N, Lee JT. X-chromosome kiss and tell: how the xs go their separate ways. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006: 71: 429-437.
- ¹⁸ Barr H, Hermann A, Berger J, Tsai HH, Adie K, Prokhortchouk A, Hedrich B, Bird A. Mbd2 contributes to DNA methylation-directed repression of the xist gene. *Mol Cell Biol* 2007, 27: 3750-3757.
- ¹⁹ Sharp A, Robinson D, Jacobs P. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet* 2000: 107: 343-349.
- ²⁰ Takagi N, Sasaki M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse embryos. *Nature* 1975: 256: 640-642.
- ²¹ Looijenje L, Gillis A, Verkerk A, van Putten W, Oosterhuis J. Heterogenous X inactivation in trophoblastic cells of human full-term female placentas. *Am J Hum Genet* 1999: 64: 1445-1452.
- ²² Lee JT, Lu N. Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. *Cell* 1999: 99: 47-57.
- ²³ Schmidt M, Du Sart D. Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the inactivation pattern in females with balanced X; autosome translocations, a review of 122 cases. *Am J Med Genet* 1992: 42: 161-169.
- ²⁴ Knudsen GPS, Pedersen J, Klingenberg O, Lygren I, Orstavik KH. Increased skewing of X chromosome inactivation with age in both blood and buccal cells. *Cytogenet Genome Res* 2007: 116: 24-28.
- ²⁵ Monteiro J et al. Commitment to X inactivation precedes the twinning event in monozygotic MZ twins. *Am J Hum Genet* 1998: 63: 339-346.
- ²⁶ Lau AW et al. Somatic segregation errors predominantly contribute to the gain or loss of a paternal chromosome leading to uniparental disomy for chromosome 15. *Clin Genet* 2000: 57: 349-358.
- ²⁷ Fey MF et al. Clonality and X-inactivation patterns in hematopoietic cell populations detected by the highly informative M27B DNA probe. *Blood* 1994: 83: 931-938.
- ²⁸ Gale RE, Fielding AK, Harrison CN, Linch DC. Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *Br J Haematol* 1997: 98: 512-519.
- ²⁹ Orstavik KH. Skewed X inactivation in healthy individuals and in different diseases. *Acta Paediatrica* 2006: 451: 24-29.

- ³⁰ Buller RE, Sood AK, Lallas T, Buekers T, Skilling JS. Association between nonrandom X-chromosome inactivation and BRCA1 mutation in germline DNA of patients with ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 339-346.
- ³¹ Kristiansen M, Langerød A, Knudsen GP, Weber BL, Borresen-Dale AL, Orstavik KH. High frequency of skewed X inactivation in young breast cancer patients. *J Med Genet* 2002; 39: 30-33.
- ³² Kristiansen M, Helland A, Kristensen GB, Olsen AO, Loning PE, Borresen-Dale AL, et al. X chromosome inactivation in cervical cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 146: 73-76.
- ³³ Cazzola M, May A, Bergamaschi G, Cerani P, Rosti V, Bishop DF. Familial-skewed X-chromosome inactivation as a predisposing factor for late-onset X-linked sideroblastic anemia in carrier females. *Blood* 2000; 96: 4363-4365.
- ³⁴ Au WY, Ma ES, Lam VM, Chan JL, Pang A, Kwong YL. Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in elderly Chinese women heterozygous for G6PD variants. *Am J Med Genet A* 2004; 129: 208-211.
- ³⁵ Lyon MF. Gene action in the X chromosome of the mouse. *Nature* 1961; 190: 372-373.
- ³⁶ Disteche CM. Escapees on the X chromosome. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 14180-14182.
- ³⁷ Takagi N, Sasaki M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature* 1975; 256: 640-642.
- ³⁸ Looijenje L, Gillis A, Verkerk A, van Putten W, Oosterhuis J. Heterogeneous X inactivation in trophoblastic cells of human full-term female placentas. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1445-1452.
- ³⁹ Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 2004; 303: 644-649.
- ⁴⁰ Chadwick LH, Pertz LM, Broman KW, Bartolomei MS, Willard HF. Genetic control of x chromosome inactivation in mice: definition of the xce candidate interval. *Genetics* 2006; 173 (4): 2103-10
- ⁴¹ Percec I, Joanne L, Thorvaldsen, Plenge R.M., Krapp CJ, Nadeau JH, Willard HF, Bartolomei MS. An N-Ethyl-N-Nitrosourea mutagenesis screen for epigenetic mutations in the mouse. *Genetics* 164: 1481-1494.
- ⁴² Penny G.D., Kay G.F., Sheardown S.A., Rastan S., Brockdorff N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 1996; 379: 131-137.
- ⁴³ Ogawa Y., Lee J.T. Xite, X-inactivation intergenic transcription elements that regulate the probability of choice. *Mol. Cell* 2003; 11: 731-743.
- ⁴⁴ Lee JT, Lu N. Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. *Cell*. 1999; 99(1):47-57.
- ⁴⁵ Cohen DE, Davidow LS, Erwin JA, Xu N, Warshawsky D, Lee JT. The DXPas34 repeat regulates random and imprinted X inactivation. *Dev Cell*. 2007;12(1):57-71.
- ⁴⁶ Dalkilic I, Kunkel LM. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Curr Opin Genet* 2003; 13: 231-238.
- ⁴⁷ D'Souza V, Nguyen TM, Morris GE, Karges W, Pillers DA, Ray PN. A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 837-842.
- ⁴⁸ Lidov HG, Selig S, Kunkel LM. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet* 1995; 3: 329-335.
- ⁴⁹ Durbeej M, Jung D, Hjalt T, Campbell KP, Ekblom P. Transient expression of Dp 140, a product of the Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis. *Dev Biol* 1997; 181: 156-167.
- ⁵⁰ Byers TJ, Lidov HG, Kunkel LM. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet* 1993; 4: 87-93.
- ⁵¹ Scholfield J, Blake DJ, Simmons C, Morris GE, Tinsley JM, Davies KE, Edwards YH. Apo-dystrophin1 and apo-dystrophin2, products of the Duchenne muscular dystrophy locus: expression during mouse embryogenesis and in cultured cell lines. *Hum Mol Genet* 1994; 8: 1309-1316.
- ⁵² Durbeej M, Campbell KP. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 349-361.
- ⁵³ Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet* 2002; 359: 687-695.
- ⁵⁴ A. Aartsma-Rus. Development of an antisense-mediated exon skipping therapy for Duchenne Muscular Dystrophy; making sense out of nonsense. 2005. Leiden University Medical Center - Department of Human and Clinical Genetics.
- ⁵⁵ Yoshioka M, Yorifuji T, Mituyoshi I. Skewed X inactivation in manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Clin genet* 1998; 53: 102-107.
- ⁵⁶ Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard BJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 1989; 244: 1578-1580.
- ⁵⁷ Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. Skeletal muscle pathology in X chromosome linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1189-1192.
- ⁵⁸ Megeney LA, Kablar B, Garrett K, Anderson JE, Rudnicki MA. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev* 1996; 10: 1173-1183.

-
- ⁵⁹ Garry DJ, Meeson A, Elterman J, Zhao Y, Yang P, Bassel-Duby R, Williams RS. Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein WNF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5416-5421.
- ⁶⁰ Grady RM, Teng H, Nichol M, Cunningham C, Wilkinson RS, Sanes JR. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1997; 90: 729-738.
- ⁶¹ Zhou L., Rafael-Fortney J.A., Huang P., Zhao X.S., Cheng G., Zhou X., Kaminski H.J., Liu L., Ransohoff R.M. Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. *Journal of the Neurological Sciences* 2008; 264: 106–111
- ⁶² Im WB, Phelps SF, Copen EH, Adams EG, Slightom JL, Chamberlain JS. Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Hum Mol Genet* 1996; 8: 1149-1153.
- ⁶³ Rafael JA, Trickett JL, Potter AC, Davies KE. Dystrophin and utrophin do not play crucial roles in nonmuscle tissues in mice. *Muscle Nerve* 1999; 22: 517-519.
- ⁶⁴ Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1-10.
- ⁶⁵ Wertz K, Fuchtbauer E. *Dmd*^{mdx^{βgeo}}: a new allele for the mouse dystrophin gene. *Dev Dynamics* 1998; 212: 229-241.
- ⁶⁶ Rafael JA, Trickett JL, Potter AC, Davies KE. Dystrophin and utrophin do not play crucial roles in nonmuscle tissues in mice. *Muscle Nerve* 1999; 22: 517-519.
- ⁶⁷ Grady RM, Grange RW, Lau KS, Maimone MM, Nichol MC, Stull JT, Sanes JR. Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nat Cell Biol.* 1999 Aug;1(4):215-20.
- ⁶⁸ Kudoh H, Ikeda H, Kakitani M, Ueda A, Hayasaka M, Tomizuka K, Hanaoka K. A new mouse for Duchenne muscular dystrophy produced by 2.4 Mb deletion of dystrophin gene using Cre-loxP recombination system. *BBRC* 2005; 328: 370-1295.
- ⁶⁹ 't Hoen PA, de Meijer EJ, Boer JM, Vossen RH, Turk R, Maatman RG, Davies KE, van Ommen GJ, van Deutekom JC, den Dunnen JT. Generation and characterization of transgenic mice with the full-length human DMD gene. *J Biol Chem.* 2007; Dec 13.
- ⁷⁰ Sumita DR, Vainzof M, Campiotto S, Cerqueira AM, Cánovas M, Otto PA, Passos-Bueno MR, Zatz M. Absence of correlation between skewed X inactivation in blood and serum creatine-kinase levels in Duchenne/Becker female carriers. *Am J Med Genet.* 1998; 80(4):356-61.
- ⁷¹ Matthew P.M., Benjamin D., vBakel L, Squier M.V., Nicholson L.V.B., Sewry C, Barnes P.R.J., Hopkin J., Brown R., Hilton-Jones D, Boyd Y., Karpati G., Brown G.K., Crag I.W. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in duchenne muscular dystrophy carriers. *Neuromusc, Disord*, 1995; 3: 209-220.
- ⁷² Hausmanowa-Petrusewicz I, Fidziańska A, Niebrój-Dobosz I, Dorobek M, Bojakowski J. *Folia Neuropathol.* Dystrophinopathies in females. 2000; 38 (1): 7-12.