



**MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN**

**Neuromuskuläre Forschung
c/o Zentrum für Anatomie und Zellbiologie**

Angewandte Anatomie
Univ. Prof. Dr. Reginald E. Bittner

Währinger Straße 13
A-1090 Wien

Tel: **43-1-40160-37514
Fax: **43-1-40160-937500

www.meduniwien.ac.at/nmrd

ÖSTERREICHISCHE MUSKELFORSCHUNG

c/o G. v. Preyer'sches Kinderspital
Schrannenberggasse 31
1100 Wien

Leistungsbericht zum Forschungsprojekt:

(Berichtszeitraum: Januar 2013 bis Dezember 2014)

Suche nach Mutationen in Tumorgenen im Muskelgewebe von Patienten mit Muskeldystrophien

PhD-Student:

WOLFRAM Michael

Dissertationstitel:

Genetic characterization of the MD-cancer-continuum

Beginn der Dissertation:

Jänner 2012

Im Rahmen des geförderten Forschungsprojektes wurden folgende Arbeitspakete im Zeitraum von 2 Jahren abgearbeitet:

- **1) Isolation und genetische Charakterisierung von Mikrosarkomen aus Muskeln von muskeldystrophen Mausmodellen**
 - MD (Muskeldystrophie) Mausmodelle (*mdx*, *dysf*, *capn3*) zeigen eine hohe Häufigkeit von Sarkomen in der Skelettmuskulatur, in Doppelmutanten (*mdx/dysf*, *mdx/capn3*) nimmt die Häufigkeit noch zu. aCGH (array comparative Genomic Hybridisation) Daten und Bestimmung der Kopienzahländerung mittels qPCR (quantitativer PCR) bestimmter Gene in diesen Sarkomen zeigt ein Panel häufig mutierter Gene ("recurrent mutations"), unter anderem die Deletion der Tumorsuppressoren *Cdkn2a* und *Nf1*, Amplifikation der Onkogene *Met* und *Jun*, sowie Aneuploidie von Chr8 und Chr15. Die Sarkomentstehung führt zu einer stark reduzierten Lebensspanne dieser Mäuse, jedoch auch Tiere ohne Sarkom sterben im selben Alter. Eine mögliche Erklärung dafür sind sogenannte „Mikrosarkome“, welche sich sowohl in MD-Mäusen mit, als auch ohne Sarkom befinden und je nach Ausprägung beinahe den gesamten Muskel ersetzen. Auch in humanen MD Muskeln konnten wir diese endomysiale Zellansammlungen detektieren, die eine morphologische Ähnlichkeit zu den murinen Mikrosarkomen aufweisen. Unsere Arbeit ist von folgender Hypothese getrieben: Sollten sich die Mikrosarkome als Sarkomvorstufen herausstellen, indem sie die gleichen genetischen Veränderungen wie Tumorzellen teilen, und diese Veränderungen auch in den incipienten Zellen in humanen MD Muskeln nachweisbar sind, wäre eine Behandlung dieser (vermutlich muskelschädigenden) Tumorstadien mit Anti-Tumor Medikamenten in Betracht zu ziehen.
 - Zur Überprüfung der Mikrosarkome auf die sogenannten "Recurrent Mutations" (siehe oben) der MD Sarkome wurden n=15 *mdx* Tiere ohne Sarkom auf das Vorliegen von Mikrosarkomen in verschiedenen Skelettmuskeln untersucht. Die ausgewählten Tiere befanden sich in einem Alter, in dem bei Mäusen mit derselben MD-Erkrankung das spontane Auftreten von Sarkomen zu beobachten ist. Pro Tier wurden von 3-7 verschiedenen Muskeln Gefrierschnitte angefertigt. Bei einer Gesamtschnitttiefe von ~900µm jedes Muskels, wurde alle 200µm ein Schnitt H&E (Hämatoxylin und Eosin) gefärbt und auf das Vorliegen von Mikrosarkomen untersucht. In 13 von 71 untersuchten Muskeln wurden auffällige Zellnester entdeckt, und für die Isolation der Mikrosarkome für LCM (Laser Capture Microdissection microscopy) präpariert. Nach qPCR (quantitative PCR)-Untersuchung auf das Vorliegen von "recurrent mutations" zeigten *mdx* Mikrosarkome im Vergleich zu n=29 *mdx* Sarkomen eine ähnliche Häufigkeit von Tumorsuppressorgen-Deletionen (3 von 13 Mikrosarkomen mit *Cdkn2a* Deletion, 2 von 13 Mikrosarkomen mit *Nf1* Deletion; 28% bzw. 17% bei *mdx* Sarkomen); jedoch wurden keine Aneuploidien der Chromosomen 8 und 15 festgestellt, wie dies in MD-Sarkomen sehr wohl der Fall war (59% bzw. 69% bei *mdx* Sarkomen). Auch lagen in Mikrosarkomen keine Amplifikationen von Onkogenen vor (*Met* und *Jun*, 17% bzw. 14% bei *mdx* Sarkomen). Somit scheint im Gegensatz zu den veränderten Kopienzahlen der Onkogene die Deletion von *Cdkn2a* und *Nf1* ein frühes Ereignis zu sein, welches im selben Ausmaß in Sarkomen wie auch in Mikrosarkomen vorhanden ist. Es stellte sich jedoch heraus, dass das Panel an untersuchten Genen zu klein für die genetische Charakterisierung ist, weswegen bis dato noch keine Analysen der incipienten Mikrosarkome in humanen MD Muskelbiopsien durchgeführt wurden. Selbst für die Charakterisierung der MD Sarkome scheinen die bekannten "recurrent mutations" nicht auszureichen, da es

z.B. einen hohen Anteil von Proben ohne Onkogen Amplifikation gibt. Aufgrund der bisher erzielten Ergebnisse erscheint eine Exome Sequenzierung von MD Sarkomen notwendig um die kausalen Mutationen der Sarkomgenese zu detektieren.

- **2) Untersuchung des tumorigenen Potentials von incipienten Sarkomzellen in Zellkulturen aus *mdx* Muskeln**
 - Unter der Annahme, dass die in Zellkultur genommenen Muskeln von *mdx* Tieren ohne sichtbare Sarkome Mikrosarkome enthalten, wurden n=18 Muskeln (von n=9 verschiedenen *mdx* Tieren) in Zellkultur behalten. Bei Passage 5 zeigte keine der Zellkulturen "recurrent mutations" (normale Kopienzahlen der untersuchten Gene nach qPCR Analyse) und keinerlei Mutationen im *Trp53*-Gen. Die am stärksten proliferierenden Zellen (n=4) wurden weiter kultiviert, traten jedoch in Passage 6 in die replikative Seneszenz ein (stark reduzierte Proliferation, deformierte Zellkerne, Mikronuklei), welche sie nach Passage 9 durchbrachen. In Passage 13 wurden diese Kulturen erneut auf "recurrent mutations" getestet: dabei wurde in einer Kultur mit epithelialem Wachstumsverhalten eine Deletion im *Prima1*-Gen und einer weiteren Zellkultur mit einer Amplifikation des *Mdm2*-Locus detektiert. Um eine Abklärung des tumorigenen Potentials dieser Zellen *in-vivo* überprüfen zu können, wurde die subkutane Injektion der Passage 13 Zellen in immundefiziente SCID Mäuse (n=2 Tiere pro Zellkultur, Verlauf nach der Injektion 6 Monate verfolgt) vorgenommen, ohne dass jedoch Tumore entstanden. Es lässt sich nicht ausschließen, dass die genetischen Veränderungen in der Zellkultur *de novo* entstanden sind und nicht von möglichen Mikrosarkomen herrühren.
- **3) Überprüfung häufig mutierter Gene in MD Sarkomen**
 - Um die genetische Charakterisierung von Mikrosarkomen zu verbessern, wurden die murinen Homologe bekannter häufig mutierter Gene humaner Krebserkrankungen in MD Sarkomen untersucht (zur Abklärung vor einer "Whole-exome" Sequenzierung). Neben den häufig mutierten Onkogenen *Braf*, *Kras*, *Kit*, *Pik3ca*, und *Hras*, sowie den Tumorsuppressoren *Trp53*, *Apc*, *Cdkn2a*, und *Rb1* fanden sich nach Sequenzierung der entsprechenden Hotspot-Regionen lediglich Mutationen in *Trp53* in 6 von 41 MD Sarkomen. Diese Mutationen verursachen entweder eine verfrühte Termination der *Trp53* Translation (p.Gln133*), oder unter anderem einen Aminosäureaustausch (p.Glu255Lys, p.Arg246Gln, p.Met240Lys). Nach einem Abgleich der Mutationen mit den korrespondierenden Positionen am humanen *TP53* Gen zeigte sich eine Übereinstimmung der Veränderungen, wie sie bei dem Li-Fraumeni Syndrom vorliegen (Keimbahn Mutation von *TP53*, welches unter anderem Weichteilsarkome verursacht). Interessanterweise zeigten 4 der 6 Sarkome (alle 6 waren *mdx* oder *mdx/dysf* Doppelmutanten) eine Amplifikation der Onkogene *Met* oder *Jun*, und dazu entweder eine heterozygote Deletion von *Cdkn2a* oder von *Nf1*. Die *Trp53* Mutationen dienten als Marker, um die unterschiedlichen Tumoreale dieser Sarkome sowie Mikrosarkome aus kontralateralen Muskeln zu untersuchen (LCM, Sequenzierung). Dabei stellte sich heraus, dass die morphologisch unterschiedlichen Areale der Sarkome unterschiedliche Anteile an Zellen mit der *Trp53* Mutation und Onkogen Amplifikation aufweisen. Dies legte den Schluss nahe, dass beide Ereignisse erst spät und unabhängig voneinander während der Tumorigenese auftreten. In den Sarkomen angrenzender oder eingeschlossener Muskulatur, sowie in Mikrosarkomen kontralateraler Muskeln waren weder eine Onkogen Amplifikation noch die *Trp53* Mutation nachweisbar. Daraus folgt, dass die untersuchten Mikrosarkome keine Metastasen der primären Sarkome sein

können, und die beiden Ereignisse wahrscheinlich unabhängig voneinander entstanden sind. In den korrespondierenden Sarkom-Zellkulturen setzten sich die Zellen mit *Trp53*-Mutation vollständig durch, wohingegen der Anteil der Onkogen Amplifikation rückläufig war.

- **4) Alternatives *Dmd* Splicing in MD Muskeln**

- Unter der Hypothese, dass die Re-Expression von Dystrophin in Muskeln von *mdx*-Mäusen durch alternatives Splicing verursacht ist, könnte dies ein Ausdruck einer generellen „Spliceopathie“ in dystrophischen Muskeln sein. Folglich überprüften wir, ob auch Transkripte von anderen Genen in MD Muskeln alternativem "Splicing" unterliegen. Wir testeten zum einen Utrophin (*Utrn*), dessen Sequenz große Homologie zum *Dmd*-Locus aufweist, als auch *Dysf*, dessen Re-Expression wir schon in *Dysf*-defizienten Sarkomen beobachten konnten (unpublizierte Daten). Nach Etablierung einer geeigneten Methode zum Nachweis alternativen *Dmd* "Splicings" (spezifische cDNA Synthese ausgehend von *Dmd* 3'UTR; eine Erstrunden-PCR zur Amplifikation aller *Dmd* Transkriptvarianten von *Dmd* Ex1 bis *Dmd* Ex79 amplifiziert auch das ~11kb kanonisch gesplICTes *Dmd*; anschließend Re-PCR zur Amplifikation spezifischer Splicevarianten unter Diskriminierung des kanonisch gesplICTen *Dmd*, sowie Bestätigung der Splicevarianten durch Sequenzierung), wurden zahlreiche noch nicht publizierte *Dmd* Splicevarianten auf RNA Ebene nachgewiesen (28 verschiedene in-frame, 14 verschiedene out of frame Splicevarianten; bei zwei in-frame Varianten blieb das *Dmd* Exon 23 erhalten). In denselben RNA Proben waren teilweise mehrere Splicevarianten nebeneinander nachweisbar. Bestimmte Splicevarianten fanden sich aber auch in mehreren Proben (*Dmd* Ex9:45, *Dmd* Ex13:45, *Dmd* Ex13:48, *Dmd* Ex18:30, *Dmd* Ex18:45, *Dmd* Ex1:75), jedoch scheint es keine Präferenz der Splicevarianten zu geben. Bei der Analyse der *Utrn*- und *Dysf*- Transkripte (ebenfalls nach einer spezifischen cDNA Synthese ausgehend von der 3'UTR des jeweiligen Gens) konnten trotz zahlreicher unterschiedlicher PCR Produkte keine Splicevarianten nachgewiesen werden. Alternatives Splicing scheint daher auf *Dmd* beschränkt zu sein. Es stellte sich jedoch die Frage, ob alternatives Splicing von *Dmd* nur in Muskeln von *mdx* Tieren vorkommt, oder ob auch andere MD Mausmodelle davon betroffen sind. Tatsächlich fanden sich die gleichen Splicevarianten in *Dmd*-kompetenten Dysferlin-defizienten Muskeln nebst dem kanonisch gesplICTen *Dmd* Transkript (Dp427). Daraufhin wurden auch Muskeln von jungen und alten Wildtyp Tieren auf diese Splicevariante getestet, welche diese überraschenderweise ebenfalls aufwiesen. In *mdx* Muskeln waren diese Splicevarianten jedoch häufiger und mit größerer Abundanz nachweisbar, da durch Abbau des mutierten kanonisch gesplICTen Transkript die kürzeren Varianten besser amplifizierbar waren als in *Dmd*-kompetenten Muskeln mit einer höheren Kopienzahl des Dp427 Transkripts. Eine exakte Quantifizierung der Transkriptvarianten war bis dato nicht erfolgreich, jedoch lässt sich das alternative Splicing von *Dmd* in *mdx* Muskeln auf <1% des noch vorhandenen kanonisch gesplICTen *Dmd* Transkripts abschätzen (qRT-PCR Analyse). Alternatives *Dmd* Splicing scheint eine grundlegende Variabilität dieses Transkripts darzustellen, die sich nicht auf *mdx* Tiere beschränkt. Bei einem Vergleich der nachgewiesenen Splicevarianten zwischen *mdx* Muskeln und *Dmd*-kompetenten Muskeln (6 von 8 *mdx*, 13 von 21 *dysf*, 5 von 7 Wildtyp) zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung von in-frame und out of frame Spliceereignissen (*mdx*: 16 von 17 in-frame; *dysf*: 13 von 22 in-frame; Wildtyp: 5 von 11 in-frame; MD Sarkome: 6 von 7 in-frame; in Muskel und Sarkom Zellkulturen war nur Dp71 und kein Dp427 Transkript nachweisbar). Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe das in *mdx* Muskeln eine Selektion auf in-frame

Splicevarianten welche für ein verkürztes Dystrophin codieren besteht (dies deckt sich mit der klonalen Expansion von "revertant fibers" (revertierte Fasern in *mdx* Muskeln). In Proteinlysaten von *mdx*, *dysf* und Wildtyp-Muskeln waren im Gegensatz zu *mdx* Sarkomen keine der erwarteten alternativen Dystrophinproteine nachweisbar. Immunohistochemisch lassen sich "revertant fibers" gut in *mdx* Muskeln darstellen und via LCM isolieren.

- **5) RNA Sequenzierung zur Suche genetischer Veränderungen**

- Zur Detektion von Punktmutationen in Onkogenen und Tumorsuppressoren, alternativem Splicing, Fusionsgenen und Transkriptlevel wurde als Pilotexperiment bei einem *mdx* Sarkom mit unauffälligem aCGH Profil (keine "recurrent mutations") eine RNA Sequenzierung durchgeführt (GATC Transcriptome Next Generation Sequencing). Nach der bioinformatischen Auswertung und Abgleich der Ergebnisse mit bekannten Tumorgenen (u.a. NCG4.0, Network of Cancer Genes), zeigten sich unbekannte Fusionstranskripte, welche geeignete Kandidaten für die Untersuchung in MD Muskeln und Sarkomen darstellten (zum Vergleich: das Fusionsprotein aus *Pax3:Foxo1a* kommt häufig in humanen alveolären Rhabdomyosarkomen vor.). Zur Bestätigung der Fusionstranskripte wurden nach einer Oligo-dT cDNA Synthese und entsprechender Endpunkt-PCR die PCR Produkte sequenziert. Bei den beiden Fusionstranskripten *Ech1:Lgals4* und *Pspc1:Gm16973* stellte sich heraus das diese nicht nur in MD Sarkomen sondern auch in jungen und alten Wildtyp Muskeln vorkommen (n=6) und daher für die genetische Charakterisierung der Sarkome nicht relevant sind. Das Fusionstranskript *Cdkn2a:Gm12606* (interne Bezeichnung „*MD-Arf*“) war in MD Sarkomen und MD Muskeln (keine Mikrosarkome erkennbar), jedoch nicht in Wildtyp Muskeln nachweisbar (siehe Tabelle). (Anmerkung: Nachweisbar in MD Muskeln und Sarkomen mit Bl/6 und Bl/10 Hintergrund, kein Nachweis in *mdx* Muskeln mit C3H Hintergrund, kein Nachweis in Wildtyp Tieren mit Bl/6 oder Bl/10 Hintergrund.) Bei *MD-Arf* handelt es sich um verschiedene Transkriptvarianten zwischen dem Tumorsuppressor *Cdkn2a* Ex1b (*p19 Arf* Transkript) und der long non-coding RNA *Gm12606*. Die häufigste Variante ist *Cdkn2a* Ex1b:*Gm12606* Ex4, welche sogar ein 16.7 kDa Proteinprodukt ergeben würde, das teilweise durch *Gm12606* codiert wird. Zwischen *Cdkn2a* Ex1a (*p16 Ink4a* Transkript) und der lncRNA nachweisbar war jedoch kein Fusionstranskript nachweisbar. Interessanterweise liegen beide vom Fusionstranskript betroffenen Loci am selben Chromosom und sind direkt benachbart (intergenische Region ~40kb), auch die beiden anderen Fusionstranskripte weisen diese Eigenschaften auf und sind teilweise nur 1.6kb voneinander getrennt. *Gm12606* scheint Mausspezifisch zu sein, da sich keine homologe Sequenz im humanen Genom befindet. *MD-Arf* tritt unabhängig vom *Cdkn2a* Deletionsstatus auf, da in 4 von 9 MD Sarkomen mit nachweisbaren *MD-Arf* die *Cdkn2a* Gendosis (qPCR von *Cdkn2a* Ex1b, Ex1a, Ex2, Ex3) unverändert ist. Im Vergleich zu *mdx* (40%) oder *dysf* (27%) Muskeln ist die Häufigkeit in Doppelmutanten erhöht (63%), und am höchsten in Sarkomzellkulturen (71%). Interessanterweise war *MD-Arf* in 1 von 9 Wildtyp Lebertumoren nachweisbar. Bei einer PCR ohne cDNA Synthese lässt sich *MD-Arf* nicht nachweisen, wodurch sich dessen Existenz auf DNA Ebene (als Pseudogen) ausschließen lässt. Es findet sich logischerweise auch nicht in *p19 Arf*^{-/-} Muskeln. Bei optimalem Ablauf (<20min zwischen Gefrierschnitt und Lyseschnitt) lässt sich aus von LCM Material isolierter RNA *MD-Arf* ebenfalls nachweisen (RIN, ein Maß für die RNA-Integrität, teilweise sogar >8.0), wodurch sich eine Analyse von Tumorsubpopulationen und Mikrosarkomen ermöglicht. Nach Fraktionierung von Zellkernen und Cytoplasma

von Sarkomzellkulturen lässt sich *MD-Arf* nach einer Oligo-dT cDNA Synthese ebenfalls in der cytoplasmatischen Fraktion nachweisen, was die Vermutung für eine tatsächliche Translation erhärtet. Als Kontrolle für die Reinheit der Fraktionen diente eine *dysf* Sarkomzellkultur welche eine Splicesite-Mutation trägt bei der bei allen *Dysf* Transkripten im Cytoplasma *Dysf* Ex45 fehlt, im Kern aber noch vorhanden ist. Für einen Hinweis auf tatsächliche Translation des Fusionstranskripts (es könnte auch als regulatorische RNA wirken) wurde aus denselben Zellkulturen eine Polysomenfraktionierung mittels Sukroседичтеgradiеntеnzentrifugation durchgeführt. Stark translatierte und dadurch eng mit Ribosomen besetzte mRNA wird in der dichtesten Fraktion erwartet. Sollte *MD-Arf* tatsächlich translatiert werden ließe es sich auch mit einem geeigneten Antikörper auf Proteinebene neben p19 ARF nachweisen (Santa Cruz p19 ARF M-60, sc-22784). Zur funktionellen Charakterisierung lässt sich das Fusionstranskript in Zellen ohne *MD-Arf* überexprimieren oder in *MD-Arf* positiven Zellen stilllegen (siRNA gegen *Gm12606*). Da *Cdkn2a* Ex1b für die Aminosäuren 1-63 des p19 ARF und MD-ARF codiert, und die Aminosäuren 1-20 für die Bindung an MDM2 verantwortlich sind, liegt die Vermutung nahe, dass MD-ARF mit p19 ARF um die Bindestelle an MDM2 konkurrieren könnte und so einen Einfluss auf die Lokalisierung und Aktivität von MDM2 in der Zelle hat. Das entsprechende Signal für den Kernimport von ARF-MDM2 befindet sich nämlich bei den Aminosäuren 82-101, welche auf MD-ARF nicht mehr vorhanden sind.

- Zu den nächsten Zielen, neben dem Nachweis von MD-ARF auf Proteinebene und der funktionellen Charakterisierung sowie Lokalisierung, gehört die Erhöhung der Fallzahlen zur statistischen Auswertung, Untersuchung von Nicht-Muskel Geweben der MD Tiere mit *MD-Arf*, sowie die Suche in nicht-MD Tumoren bzw. in proliferierenden Muskelzellen (C2C12).

○

	<i>MD-Arf</i>		Sarkom-Häufigkeit
Wildtyp Muskel *	0 von 11	0%	
Wildtyp Leber Tumor *	1 von 9	11%	
<i>mdx</i> X3H Muskel **	0 von 8	0%	12%
<i>mdx</i> Muskel (X) *	4 von 10	40%	11-38%
<i>dysf</i> Muskel (J) *	3 von 11	27%	32%
<i>mdx/dysf</i> Muskel (XJ) *	5 von 8	63%	43%
<i>mdx/capn3</i> Muskel (CX) *	4 von 8	50%	53%
<i>mdx</i> Muskel Zellkultur (X) ***	1 von 4	25%	6%
MD Sarkom (CX, UX, XJ, J) *	11 von 18	61%	
MD Sarkom Zellkultur *	10 von 14	71%	

(Stamm-Hintergrund: *...Bl/6, Bl/10; **...C3H; *** ...Balb/c)

- **Zusammenfassung**

Die bisher erhobenen Daten weisen darauf hin, dass in dystrophischen Muskeln zahlreiche Tumor-Mutationen vorliegen. Wir konnten insgesamt das Spektrum der molekularen Veränderungen deutlich erweitern und näher charakterisieren. Auch ist es gelungen, die technischen Voraussetzungen zur Untersuchung dieser molekularen Veränderungen aus kleinsten Muskelproben zu evaluieren und zu perfektionieren. Somit konnte der Grundstein für die gezielte Analyse von humanen Muskelbiopsien gelegt werden.

- *mdx* Sarkome und sogenannte Mikrosarkome teilen sich Deletionen in den Tumorsuppressoren *Cdkn2a* und *Nf1*: wir vermuten daher, dass es sich bei diesen genetischen Veränderungen um frühe Ereignisse der Sarkomentstehung handeln dürfte.
- Onkogen Amplifikationen und *Trp53*-Mutationen sind offenbar späte Ereignisse, da sie in Sarkomen, nicht aber in Mikrosarkomen nachweisbar sind.
- Mikrosarkome sind offenbar keine Metastasen von Sarkomen sondern entstehen unabhängig.
- *mdx* Muskelzellkulturen zeigen trotz genetischer Veränderungen nach hoher Passagezahl kein tumorigenes Potential *in vivo*.
- Ausgenommen von *Trp53* sind keine Mutationen in häufig mutierten Tumorgenen (u.a. *Braf*, *Kras*, *Pik3ca*) in murinen MD Sarkomen nachweisbar.
- Alternatives *Dmd* Splicing ist nicht auf dystrophische *mdx* Muskeln beschränkt sondern auch in *Dmd*-kompetenten dystrophischen Muskeln sowie sogar in Wildtyp Muskeln nachweisbar.
- Detektion und beginnende Charakterisierung eines neuen Muskeldystrophie- und Sarkom-spezifischen Fusionstranskripts: *Cdkn2a* Ex1b:*Gm12606* Ex4 (*MD-Arf*) in MD Muskeln und MD Sarkomen, aber nicht in Wildtyp Muskeln; *MD-Arf* ist deutlich höher in dystrophischen Muskeln von MD Doppelmutanten exprimiert.