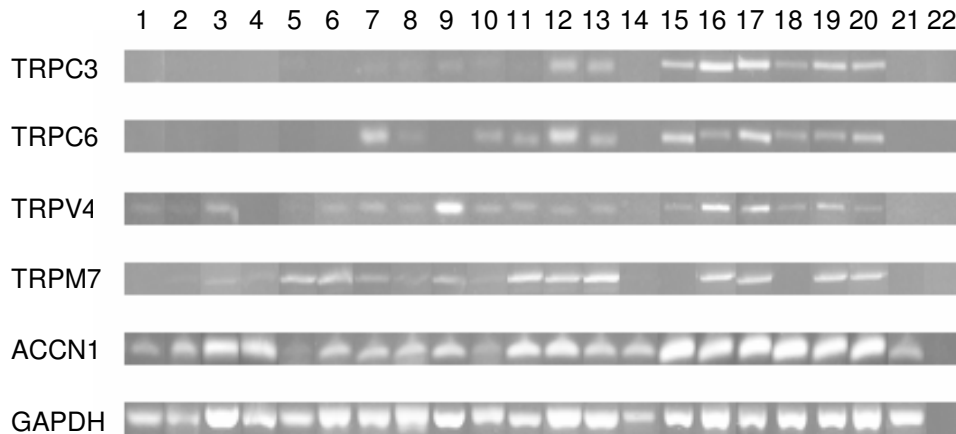


#### **4. Ergebnisse:**

##### **4.1 Nachweis von Transkripten von DEG/ENaC- und TRP-Kationenkanälen in Balb/c-Mäusen**

Für den Nachweis der DEG/ENaC- und TRP-Kanal-Transkripte in der Balb/c-Maus wurde die Total-RNA aus verschiedenen epithelialen Geweben, wie z. B. Niere, Milz, Leber und Lunge, aus den Geschlechtsorganen Uterus, Ovar, Hoden, Nebenhoden und Samenblase sowie aus Muskelgeweben (Dünndarm, Aorta, Musculus gastrocnemius, Zwerchfell und Herz) isoliert. Weiterhin wurde das Gehirn in Vorderhirn, Kleinhirn, Hippocampus, Stammhirn, Grosshirn und Stammganglien unterteilt und für die RNA-Gewinnung genutzt. Um das Expressionsschema der DEG/ENaC- und TRP-Kanäle in Myoblasten wiedergeben zu können, wurde aus undifferenzierten Zellen der C2C12-Muskelzelllinie ebenfalls die RNA isoliert und für die weiteren Experimente genutzt. Mittels genspezifischer Primer wurde mit Hilfe der Standard RT-PCR das gewünschte Genspezifische Transkript amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mittels DNA-Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt und die erhaltenen Banden protokolliert. Von jedem Gen wurde das spezifische Produkt gewonnen, in einen Vektor kloniert und sequenziert (Abschnitt 3.2.6, 3.2.7, 3.2.9). Für alle Gentranskripte wurden die erwarteten Sequenzen erhalten und somit die PCR-Amplifikate als spezifisch klassifiziert.

In einem Gewebescrenning wurde die allgemeine Expression der 30 Mitglieder der DEG/ENaC-, TRPC-, TRPV- und TRPM-Familie sowie TRPA1 in den oben genannten Geweben untersucht. Die Abb. 9 zeigt beispielhaft die PCR-Amplifikate in der Gelelektrophorese für TRPC3, TRPC6, TRPV4 und TRPM7 sowie ACCN1. Als Positivkontrolle und zur Kontrolle der Qualität der cDNA wurde die mRNA des „housekeeping“-Gens GAPDH, kodierend für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, genutzt und in allen Geweben registriert. Der Einsatz von Wasser anstelle von cDNA im PCR-Ansatz diente der Negativkontrolle.



**Abb. 9: Gelelektrophorese von mRNA-Transkripten von TRPC3, TRPC6, TRPV4, TRPM7, ACCN1 und GAPDH**

Der Nachweis der Transkripte erfolgte in unterschiedlichen Geweben von Balb/c-Mäusen mittels Standard RT-PCR und Gelelektrophorese.

(1) Dünndarm, (2) Aorta, (3) M. gastrocnemius, (4) Zwerchfell, (5) Herz, (6) Leber, (7) Lunge, (8) Milz, (9) Niere, (10) Hoden, (11) Nebenhoden, (12) Samenblase, (13) Ovar, (14) Uterus, (15) Vorderhirn, (16) Kleinhirn, (17) Hippocampus, (18) Stammhirn, (19) Grosshirn, (20) Stammganglien, (21) C2C12-Muskelzelllinie, (22) Wasser

Die Ergebnisse der Standard RT-PCR der Ionenkanäle TRPC1 bis TRPC7 sind in Tabelle 8 (siehe Anhang) zusammengestellt. Wie dieser Tabelle zu entnehmen ist, konnte TRPC1 in allen untersuchten Gehirnabschnitten der Balb/c-Maus nachgewiesen werden. Als einziger Ionenkanal dieser Subfamilie wurde TRPC1 in der Aorta und in der C2C12-Muskelzelllinie detektiert. Weiterhin wurde TRPC1 in der Lunge, Niere, im Hoden, Nebenhoden, in der Samenblase und in den Ovarien erhalten. TRPC2 konnte mit dieser Technik im Kleinhirn, Hippocampus, Grosshirn und in den Stammganglien nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde TRPC2 in der Niere, im Hoden, Ovar und als einziger Kandidat dieser Subfamilie im Uterus detektiert. Die TRPC3-mRNA mit einer Fragmentlänge von 317 Bp wurde mit unterschiedlichen Intensitäten in allen untersuchten Gehirnabschnitten nachgewiesen. Am stärksten war die Expression im Kleinhirn und Hippocampus. Weiterhin wurde TRPC3 mit geringerer Intensität in der Niere, im Hoden, in der Samenblase und im Ovar detektiert (Abb. 9).

TRPC4-mRNA konnte nur in wenigen Geweben nachgewiesen werden. Jener Ionenkanal wurde lediglich in den untersuchten Gehirnabschnitten, der Samenblase und den Ovarien registriert. Die mRNA-Transkripte für TRPC5 und TRPC7 wurden, außer in den Gehirnabschnitten, nur noch im Hoden und in der Samenblase nachgewiesen.

TRPC6 wurde mit einer Fragmentlänge von 326 Bp in der Lunge, Samenblase und in allen untersuchten Gehirnabschnitten gefunden, wobei hier die Expression im Hippocampus und im Vorderhirn überwog (Abb. 9). In geringerem Maße wurde TRPC6-mRNA in der Milz, im Hoden, Nebenhoden und im Ovar registriert.

Die Expressionen der mRNAs der TRPV Familie mit seinen 6 Mitgliedern sowie TRPA1 sind in Tabelle 9 (siehe Anhang) zusammengefasst. Das erste Mitglied, TRPV1, wurde in den Ovarien, im Kleinhirn und im Hippocampus nachgewiesen. TRPV2 wurde als einziges Mitglied dieser Subfamilie im Zwerchfell gefunden. Weiterhin wurden Transkripte für TRPV2 in der Lunge, Milz, dem Nebenhoden, der Samenblase, den Ovarien, in den verschiedenen Gehirnabschnitten und in der C2C12-Muskelzelllinie nachgewiesen. Ebenfalls in allen Gehirnabschnitten wurde TRPV3 gefunden. Des Weiteren wurde TRPV3 in der Niere, der Samenblase und in den Ovarien registriert. Mit einer Fragmentlänge von 249 Bp wurden Transkripte von TRPV4 nachgewiesen (Abb. 9). Die stärksten mRNA Expressionen konnten in der Niere sowie im Kleinhirn und Hippocampus detektiert werden. Außerdem wurde TRPV4 auch in den anderen Gehirnabschnitten sowie im Dünndarm, Musculus gastrocnemius, in der Leber, Lunge, Milz, in den männlichen Reproduktionsorganen und im Ovar nachgewiesen. TRPV5 wurde als einziges Familienmitglied im Herz gefunden. Weiterhin wurden positive Resultate in der Lunge, Milz, Niere, den Hoden, Nebenhoden, im Kleinhirn und im Hippocampus erhalten. Die mRNA von TRPV6 wurde im Musculus gastrocnemius, in der Leber, im Nebenhoden, in der Samenblase, im Ovar und in der C2C12-Muskelzelllinie gefunden. Außer im Kleinhirn und in den Stammganglien wurde TRPV6 in allen anderen Gehirnabschnitten registriert. TRPA1 wurde in allen untersuchten Gehirnabschnitten nachgewiesen. Daneben wurde dieser Ionenkanal in der Aorta, im Musculus gastrocnemius, in der Samenblase und im Ovar detektiert.

Die TRPM-Familie besteht aus acht Mitgliedern. Die Ergebnisse der Standard RT-PCR von TRPM1-8 sind in Tabelle 10 zusammengefasst (siehe Anhang). TRPM1 zeigte, ausgenommen im Herz und Uterus, eine durchgängige Expression in allen anderen untersuchten Geweben. Für TRPM2 wurde keine Transkripte in der Aorta, im Musculus gastrocnemius, in der Niere, im Uterus und in der C2C12-Muskelzelllinie nachgewiesen, während in allen anderen Geweben positive Amplifikate erhalten wurden. In allen Gehirnabschnitten präsent zeigte sich TRPM3, ebenso wie in den männlichen Fortpflanzungsorganen, den Ovarien, der Aorta und im Zwerchfell. Alle anderen untersuchten Gewebe waren für TRPM3 negativ.

TRPM4-mRNA konnte, außer in der Aorta, in allen anderen glatten und quergestreiften Muskeln nachgewiesen werden. Weiterhin wurden Transkripte für TRPM4 bei der Verwendung der cDNA von Milz, Hoden, Nebenhoden, Ovarien, Stammganglien und der C2C12-Muskelzelllinie in der PCR erhalten. In der C2C12-Muskelzelllinie kam ebenfalls die TRPM5-mRNA vor. Dieses Ionenkanaltranskript wurde ferner im Dünndarm, in der Aorta, im Herz, in der Lunge, Milz, Niere, im Nebenhoden, in der Samenblase und im Ovar detektiert. In den Gehirnabschnitten konnte nur im Kleinhirn, Stammhirn und in den Stammganglien eine Bande mit der entsprechenden Fragmentlänge von 360 Bp nachgewiesen werden. TRPM6 konnte in allen untersuchten Gehirnabschnitten sowie im Musculus gastrocnemius, in der Lunge, der C2C12-Muskelzelllinie und, ausgenommen der Samenblase, in den Reproduktionsorganen detektiert werden. Die TRPM7-mRNA mit einer detektierten Fragmentlänge von 195 Bp wurde dominierend im Nebenhoden, in der Samenblase, im Ovar, aber auch, außer im Stammhirn und Vorderhirn, in den anderen Gehirnabschnitten nachgewiesen. Überdies zeigten sich positive Funde, außer für den Dünndarm, Uterus und der C2C12-Muskelzelllinie, für alle weiteren Gewebe (Abb. 9). Die geringste Expression in dieser Subfamilie zeigte TRPM8. Positive Resultate wurden für Dünndarm, Aorta, Herz, Milz, Hoden, Hippocampus, Stammganglien und der Muskelzelllinie erzielt.

Neben den bereits erwähnten Ionenkanälen wurden auch der muskelspezifische Ionenkanal SCN4A, die Kationenkanäle SCNN1a, 1b und 1g sowie die pH-abhängigen Ionenkanäle ACCN1 und ACCN2 untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengestellt (siehe Anhang). Transkripte der SCN4A-mRNA mit der Fragmentlänge von 329 Bp konnten im Musculus gastrocnemius, Zwerchfell und im Herzen ebenso nachgewiesen werden, wie in der C2C12-Muskelzelllinie. Weiterhin wurde dieser Natriumkanal in der Lunge, im Hoden und Nebenhoden gefunden. SCNN1a war, außer im Dünndarm, Herz und im Uterus, in allen anderen Geweben exprimiert.

Die SCNN1b-mRNA wurde in allen untersuchten Gehirnabschnitten detektiert, ferner auch im Dünndarm, Zwerchfell, in der Leber, Lunge und der Milz sowie in den männlichen Reproduktionsorganen. Amplifikationen von SCNN1g wurden in der Aorta, im Musculus gastrocnemius, in der Lunge, Niere, im Vorderhirn, Kleinhirn, Hippocampus und im Stammhirn nachgewiesen. Transkripte des Ionenkanals ACCN1 mit einer Fragmentlänge von 110 Bp wurden in den untersuchten Geweben ubiquitär exprimiert. Die stärkste Expression zeigte sich in den verschiedenen Gehirnabschnitten, im Musculus gastrocnemius, Zwerchfell, Nebenhoden und in der Samenblase (Abb. 9). ACCN2 wurde dagegen nur in den Gehirnabschnitten, im Zwerchfell, in der Lunge und der Samenblase erfasst.

Aus diesen Analysen zeigte sich, dass fast alle getesteten Ionenkanäle im Grosshirn und die Niere exprimiert wurden. Demzufolge wurde diese Gewebe als Positivkontrollen für alle weiteren Experimente genutzt.

#### **4.2 Nachweis von Transkripten von DEG/ENaC- und TRP-Kationenkanälen in C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Um die mRNA-Quantität der genannten Ionenkanäle im Muskelgewebe zu analysieren, wurde deren Vorkommen mittels quantitativer „Real-time“ RT-PCR untersucht. Hierfür wurden 100 d alte C57Bl/10Sc-Mäuse sowie mdx-Mäuse gleichen Alters verwendet ( $n \geq 3$ ), aus deren Geweben die RNA isoliert und die auf dieser Grundlage hergestellte cDNA für die Untersuchungen eingesetzt.

Die Tests wurden mit Geweben von den Positivkontrollen Grosshirn und Niere sowie von Musculus tibialis anterior, Musculus gastrocnemius, Zwerchfell und Herz durchgeführt. Die Analyse erfolgte wie im Abschnitt 3.2.10 beschrieben, wobei die spezifische mRNA-Quantität nach Auswertung als Quotient (Ionenkanal mRNA / 18S rRNA) erhalten wurde. Statistisch signifikante Unterschiede in den Expressionsleveln von Kontroll- und mdx-Mäusen wurden durch den *Student's t-Test* ermittelt und wie folgt gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

#### 4.2.1 Quantifizierung der mRNA von TRPC1-7

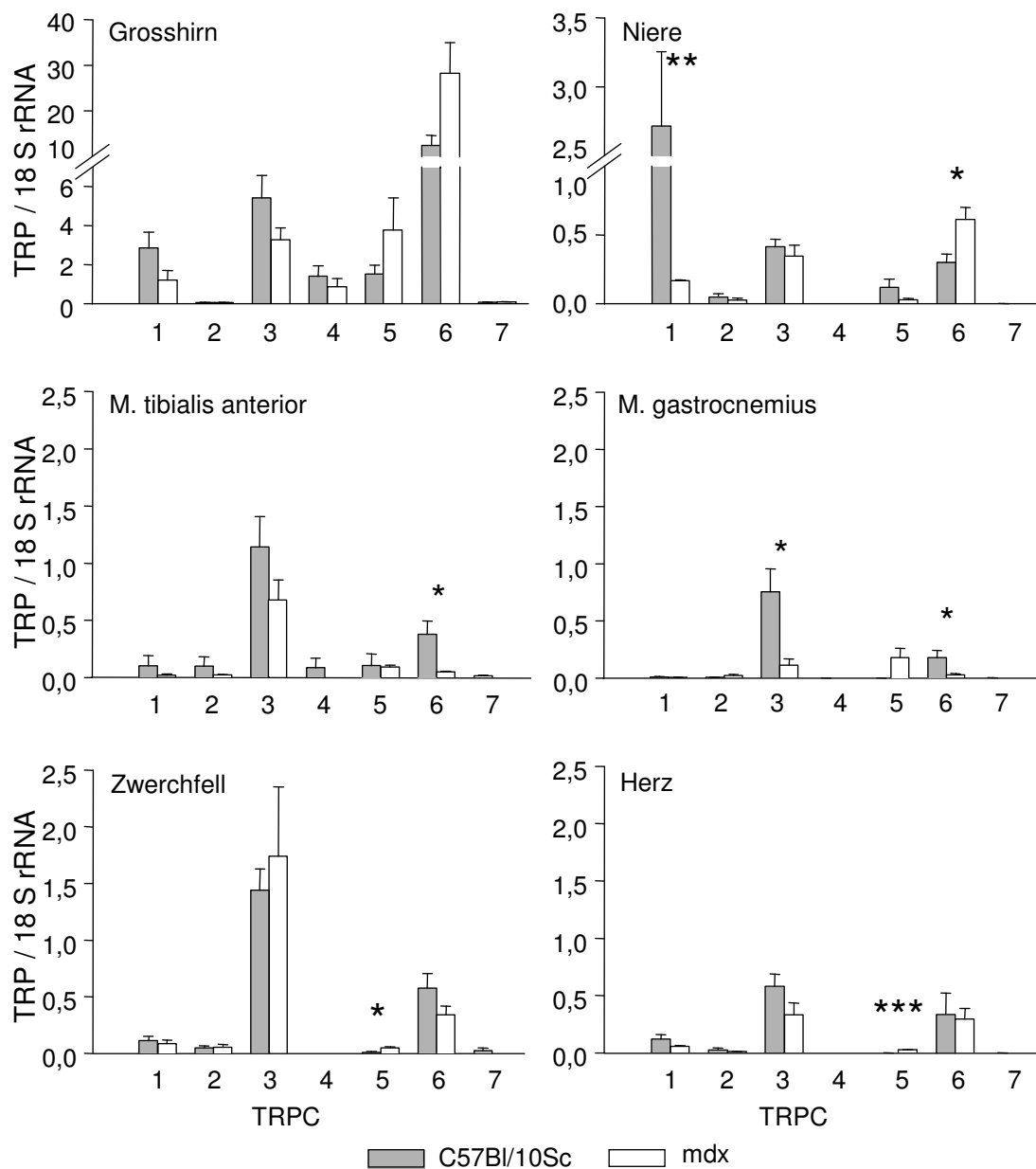
Die mRNA-Quantitäten der Mitglieder der TRPC-Familie sind in Abb. 10 dargestellt. Im Grosshirn konnten die mRNAs aller TRPC-Kanäle nachgewiesen werden, wobei die Expressionen von TRPC6, TRPC3 und TRPC1 dominierten. Weiterhin wurden keine Unterschiede in den Expressionen zwischen Kontrolltieren und mdx-Mäusen gefunden.

In der Niere konnte TRPC4 weder in Kontrollen, noch in Mutanten registriert werden, während alle anderen Vertreter detektiert wurden. Dominierend in der Niere waren TRPC1, TRPC3 und TRPC6, während TRPC2, TRPC5 und TRPC7 geringfügig exprimiert wurden. Für uns interessant waren jedoch die mRNA-Mengen im Muskelgewebe.

Im Musculus tibialis anterior von Kontrolltieren wurden alle Mitglieder dieser Subfamilie gefunden. Dominierend in der Expression war hier TRPC3, gefolgt von TRPC6. Die anderen folgten auf geringerem Level. Im Vergleich zu der Expression in den Kontrolltieren zeigte TRPC6 in den mdx-Mäusen eine signifikante Reduzierung auf ca. 1/10 des Wertes der Kontrolltiere. Bei den anderen Vertretern wurden keine Unterschiede gefunden.

Gleichsam verhielt sich die Expression der TRPCs im Musculus gastrocnemius. In den Kontrollen dominierten die mRNAs von TRPC3 und TRPC6, während die anderen auf geringeren Niveaus nachgewiesen wurden. Im Vergleich zu den Kontrollen wurden in den mdx-Mäusen signifikant geringere mRNA-Mengen für TRPC3 (ca. 1/4) und für TRPC6 (1/10) nachgewiesen.

Im Zwerchfell und Herz von Kontrollen wurden, außer TRPC4, alle anderen Mitglieder dieser Subfamilie gefunden, wobei TRPC3 und TRPC6 dominierten. Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigte TRPC5 in mdx-Mäusen eine fünffach erhöhte Expression im Zwerchfell, während im Herz eine 80-fache Steigerung registriert wurde.



**Abb. 10: Quantifizierung der mRNA von TRPC1-7 im Grosshirn, in der Niere und verschiedenen Muskelgeweben von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Die mRNA-Quantität wurde mittels „Real-time“ RT-PCR in Kopienzahl erhalten, ins Verhältnis zu der Kopienzahl der 18S rRNA gesetzt und mit 1000 multipliziert. Von  $n \geq 3$  unabhängigen Quotienten wurde der Mittelwert  $\pm$  SEM gebildet und statistische Unterschiede unter Verwendung des *Student's t-Test* ermittelt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Für uns von Bedeutung waren die mRNA-Quantitäten in den verschiedenen Muskelgeweben. Aus dieser Analyse konnte entnommen werden, dass TRPC3 und TRPC6 im Muskelgewebe dominierend exprimiert wurden und TRPC6 in mdx-Mäusen deutlich reduziert war. Von Interesse war aber auch TRPC5, welcher zwar nicht vorherrschend exprimiert wurde, aber in zwei von den vier untersuchten Muskeln signifikante Erhöhungen der mRNA-Level in mdx-Mäusen aufwies.

#### **4.2.2 Quantifizierung der mRNA von TRPV1-6 und TRPA1**

Die mRNA Expressionen von TRPV1 bis 6 sowie TRPA1 sind in Abb. 11 dargestellt. Im Grosshirn von Kontrolltieren wurden, außer TRPV1, alle anderen untersuchten Ionenkanäle dieser Gruppe nachgewiesen. Dominierend waren hier TRPV2 und TRPV4, während die anderen auf geringeren Levels detektiert wurden.

In der Niere von Kontrolltieren wurden, außer TRPV1, allen weiteren Vertreter gefunden, wobei die mRNAs von TRPV4 und TRPV5 dominierten.

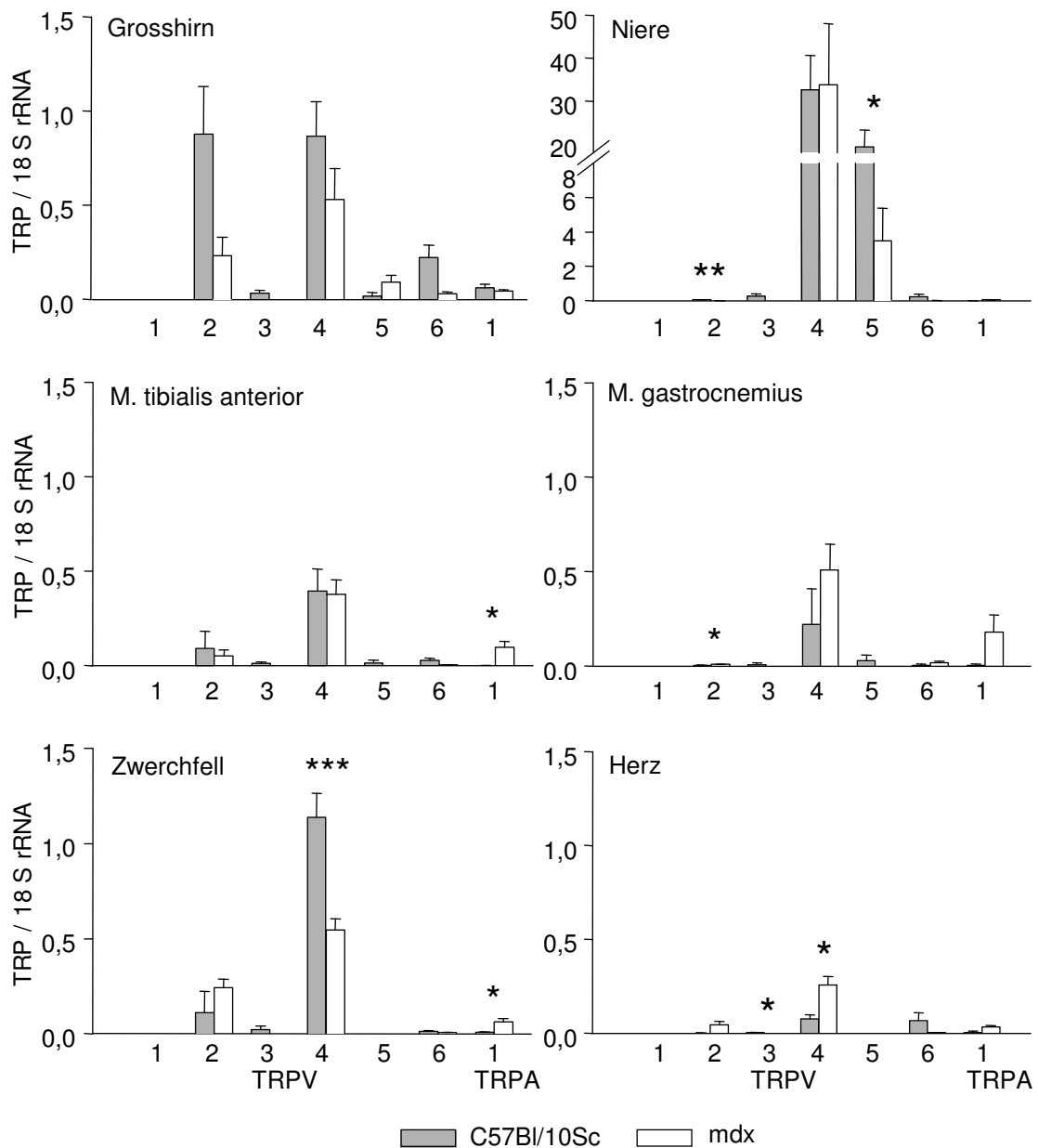
Im Musculus tibialis anterior von Kontrollen konnten, mit Ausnahme von TRPV1, alle anderen Ionenkanäle dieser betrachteten Gruppe nachgewiesen werden. Dominierend exprimiert wurde TRPV4. Im Vergleich zu den Kontrolltieren gab es in den mdx-Mäusen nur in der Expression von TRPA1 signifikante Unterschiede, dessen mRNA in mdx-Tieren 60-mal höher war.

Im Musculus gastrocnemius der Kontrolltiere wurden, außer TRPV1, alle weiteren Vertreter nachgewiesen, wobei wiederum die mRNA von TRPV4 dominierte.

Im Zwerchfell von Kontrollmäusen dominierte in der mRNA Expression TRPV4, während die anderen untersuchten Vertreter, ausgenommen TRPV1, eher gering auf einem Level von etwa 1/10 von TRPV4 exprimiert waren. Im Gegensatz zu Kontrollen zeigte TRPV4 in mdx-Mäusen in diesem Gewebe eine Halbierung der Expression, während die von TRPA1 auf das 10-fache der Expression in Kontrolltieren erhöht war.

Im Herzmuskel von Kontrollmäusen war die allgemeine Expression der TRPVs noch geringer, wobei TRPV4 dominierte und TRPV5 und TRPV1 gar nicht nachgewiesen werden konnten. TRPV3 zeigte im Herzmuskel von Kontroll- und mdx-Mäusen eine geringe Expression, während die mRNA von TRPV4 in mdx-Mäusen signifikant erhöht war.





**Abb. 11: Quantifizierung der mRNA von TRPV1-6 sowie TRPA1 im Grosshirn, in der Niere und verschiedenen Muskelgeweben von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Die mRNA-Quantität wurde mittels „Real-time“ RT-PCR in Kopienzahl erhalten, ins Verhältnis zu der Kopienzahl der 18S rRNA gesetzt und mit 1000 multipliziert. Von  $n \geq 3$  unabhängigen Quotienten wurde der Mittelwert  $\pm$  SEM gebildet und statistische Unterschiede unter Verwendung des *Student's t-Test* ermittelt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Diese Analyse zeigte, dass im Muskelgewebe die Expression von TRPV4 dominierte, während alle anderen Kandidaten eher gering exprimiert wurden. Überdies zeigte TRPA1 in zwei von vier Muskeln eine signifikant erhöhte mRNA-Quantität in mdx-Mäusen.

### 4.2.3 Quantifizierung der mRNA von TRPM1-8

Die mRNA Expressionen von TRPM1 bis 8 sind in Abb. 12 dargestellt. Im Grosshirn von Kontrolltieren wurden alle Vertreter dieser Subfamilie nachgewiesen. Dabei zeigten sich besonders TRPM7 und TRPM3 dominierend.

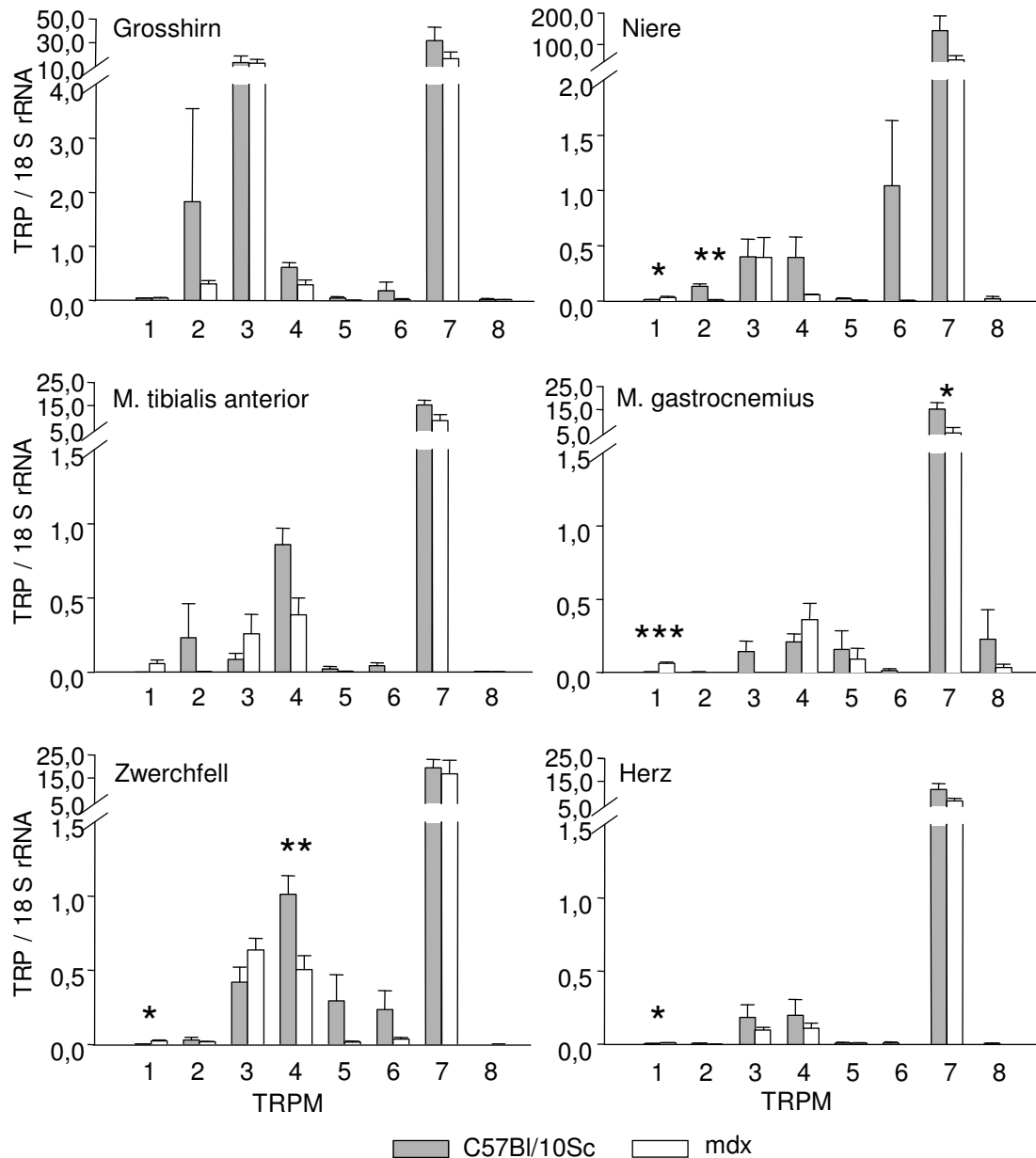
In der Niere von Kontrollen wurden ebenfalls alle Vertreter detektiert, wobei die Expression von TRPM7 mit weitem Abstand überwog. Von Bedeutung war jedoch die Expression im Muskelgewebe.

Im Musculus tibialis anterior der Kontrollmäuse wurden alle TRPMs registriert, wobei TRPM7 die stärkste Expression zeigte und fast 15-mal so hoch war, wie TRPM3 in diesem Gewebe. Die nächst höhere mRNA Expression wies TRPM4 auf, welche aber etwas geringer war, als die von TRPM3. Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigten sich in den mdx-Mäusen keine signifikanten Änderungen in den mRNA-Mengen.

Ähnlich stellte sich das Expressionsmuster im Musculus gastrocnemius von Kontrolltieren dar. Hier dominierte wieder TRPM7, während alle anderen Mitglieder dieser Familie auf einem Level von weniger als 1/30stel von TRPM7 exprimiert wurden. Im Vergleich zu den Kontrolltieren lag die mRNA-Menge von TRPM1 in mdx-Mäusen signifikant höher, wobei sich der Wert fast ver Hundertfachte. Eine signifikant verringerte Expression in mdx-Mäusen auf ein Drittel wurde für die mRNA von TRPM7 gefunden.

Im Zwerchfell von Kontrolltieren wurden alle untersuchten Ionenkanäle dieser Gruppe detektiert, wobei TRPM7 die stärkste Expression zeigte. Auf einem Level von etwa 1/20 der mRNA-Menge von TRPM7 folgte TRPM4. Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigte TRPM1 in den mdx-Mäusen eine Verzehnfachung des Expressionslevels, während sich die Menge an TRPM4-mRNA auf die Hälfte reduzierte.

Im Herz von Kontrollen lagen die mRNA-Mengen auf sehr geringem Niveau, nur TRPM7 dominierte weiterhin. Im Vergleich zu den Expressionen in Kontrolltieren wurde im Herzmuskel eine Erhöhung von TRPM1-mRNA auf das Fünffache nachgewiesen.



**Abb. 12: Quantifizierung der mRNA von TRPM1-8 im Grosshirn, in der Niere und verschiedenen Muskelgeweben von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Die mRNA-Quantität wurde mittels „Real-time“ RT-PCR in Kopienzahl erhalten, ins Verhältnis zu der Kopienzahl der 18S rRNA gesetzt und mit 1000 multipliziert. Von  $n \geq 3$  unabhängigen Quotienten wurde der Mittelwert  $\pm$  SEM gebildet und statistische Unterschiede unter Verwendung des *Student's t-Test* ermittelt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Aus der TRPM-Familie dominierten im Muskelgewebe TRPM7 und TRPM4. Da TRPM4 in der Maus aber nur monovalente Kationen und kein Kalzium leitet, wurde dieser Ionenkanal für weitere Analysen nicht in Betracht gezogen. Von den nicht dominierenden Mitgliedern zeigte TRPM1 in drei von vier untersuchten Muskelgeweben signifikante Änderungen in mdx-Mäusen und wurde daher später näher analysiert.

#### **4.2.4 Quantifizierung der mRNA von SCN4A, 5A, SCNN1a, 1b und 1g sowie ACCN1-5**

Außer den TRP-Kanälen wurden die Expressionen der muskelspezifischen spannungsgesteuerten Natriumkanäle SCN4A und SCN5A, die Mitglieder der DEG/ENaC-Familie SCNN1a, 1b und 1g sowie die pH-abhängigen Ionenkanäle ACCN1-5 untersucht. Die Resultate sind in Abb. 13 festgehalten. Im Grosshirn von Kontrolltieren wurden, bis auf ACCN5, alle anderen Kandidaten dieser Gruppe nachgewiesen. Die stärksten Expressionen zeigten ACCN1 und ACCN2.

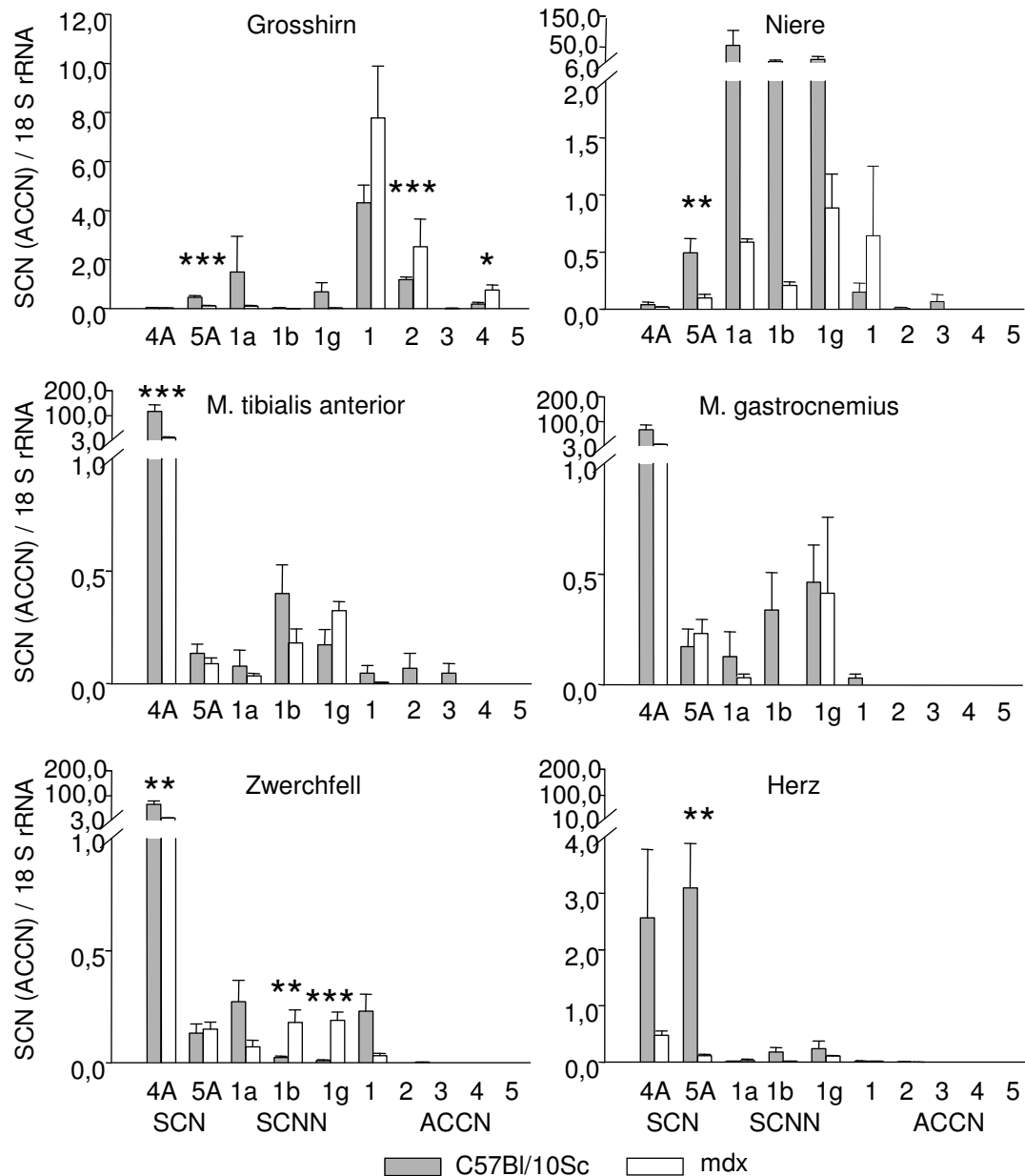
In der Niere von Kontrollen wurden, mit Ausnahme von ACCN4 und ACCN5, alle weiteren Vertreter gefunden. In den mRNA-Mengen dominierte SCNN1a, gefolgt von SCNN1g und SCNN1b auf hohem Level.

Im Musculus tibialis anterior von Kontrolltieren wurden, außer ACCN4 und ACCN5, alle anderen der oben genannten Ionenkanäle detektiert. Am stärksten war die mRNA von SCN4A vertreten, welche ca. 15-mal höher exprimiert war, als die von TRPM7. Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigte in den mdx-Mäusen SCN4A eine signifikante Reduktion der Expression auf ungefähr 1/4 des Wertes der Kontrollen.

Im Musculus gastrocnemius der Kontrollmäuse wurden, außer ACCN2 bis 5, alle weiteren Vertreter nachgewiesen. Wie erwartet dominierte die mRNA-Menge von SCN4A, während SCNN1g und SCNN1b im Vergleich zu den mRNA-Quantitäten der TRP-Kanäle im Muskelgewebe nur gering exprimiert wurden. In mdx-Mäusen wurden, im Vergleich zu Kontrolltieren, keine signifikanten Änderungen registriert.

Im Zwerchfell von Kontrolltieren konnten, außer ACCN2 bis ACCN5, alle anderen Vertreter detektiert werden, wobei die mRNA von SCN4A wieder am stärksten exprimiert war. Im Vergleich zu Kontrollmäusen zeigte SCN4A in mdx-Mäusen eine signifikante Reduzierung der Expression auf ca. 1/6 des Wertes von den Kontrollen. Eine Verzehnfachung der Expression wurde bei SCNN1b und SCNN1g registriert, jedoch nicht im dominierenden Maße.

Im Herzen von Kontrolltieren wurden die mRNAs von SCN4A und SCN5A auf etwa gleichem Level nachgewiesen. Weiterhin wurden, bis auf ACCN3, 4 und 5, welche nicht detektiert wurden, alle anderen auf einem Niveau von etwa 1/10 von SCN4A gefunden. Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigte in den mdx-Mäusen nur SCN5A eine signifikante Reduktion der Expression auf ca. 1/5 des Wertes.



**Abb. 13: Quantifizierung der mRNA von SCN4A und 5A, SCNN1a, 1b und 1g sowie ACCN1-5 im Grosshirn, in der Niere und verschiedenen Muskelgeweben von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Die mRNA-Quantität wurde mittels „Real-time“ RT-PCR in Kopienzahl erhalten, ins Verhältnis zu der Kopienzahl der 18S rRNA gesetzt und mit 1000 multipliziert. Von  $n \geq 3$  unabhängigen Quotienten wurde der Mittelwert  $\pm$  SEM gebildet und statistische Unterschiede unter Verwendung des *Student's t-Test* ermittelt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Von den untersuchten SCNNs und ACCNs zeigte keiner dieser Ionenkanäle eine dominierende Expression im Muskelgewebe oder relevante Änderungen der mRNA-Quantitäten in mdx-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren. In Bezug auf die Fragestellung scheint ihnen daher keine besondere Bedeutung zuzukommen. Eine interessante Besonderheit stellte SCN4A dar. In zwei von vier getesteten Muskelgeweben war die mRNA von SCN4A im mdx-Muskel signifikant reduziert, daher wurde dieser Ionenkanal später nochmals separat betrachtet.

### **4.3 Analysen der dominanten TRP-Kanäle in 30 d, 100 d und 365 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Aus den vorangegangenen Untersuchungen konnte entnommen werden, dass die mRNAs von TRPC3, TRPC6 und TRPV4 sowie TRPM7 im Muskelgewebe dominierend exprimiert wurden. Daher wurden in weiteren Analysen die mRNA- und Protein-Mengen der genannten Ionenkanäle quantitativ bei 30 d, 100 d und 365 d alten Kontroll- und mdx-Mäusen bestimmt. Des Weiteren wurde versucht, die mRNA und die Kanalproteine auf zellulärer Ebene zu lokalisieren.

#### **4.3.1 Analyse von TRPC3**

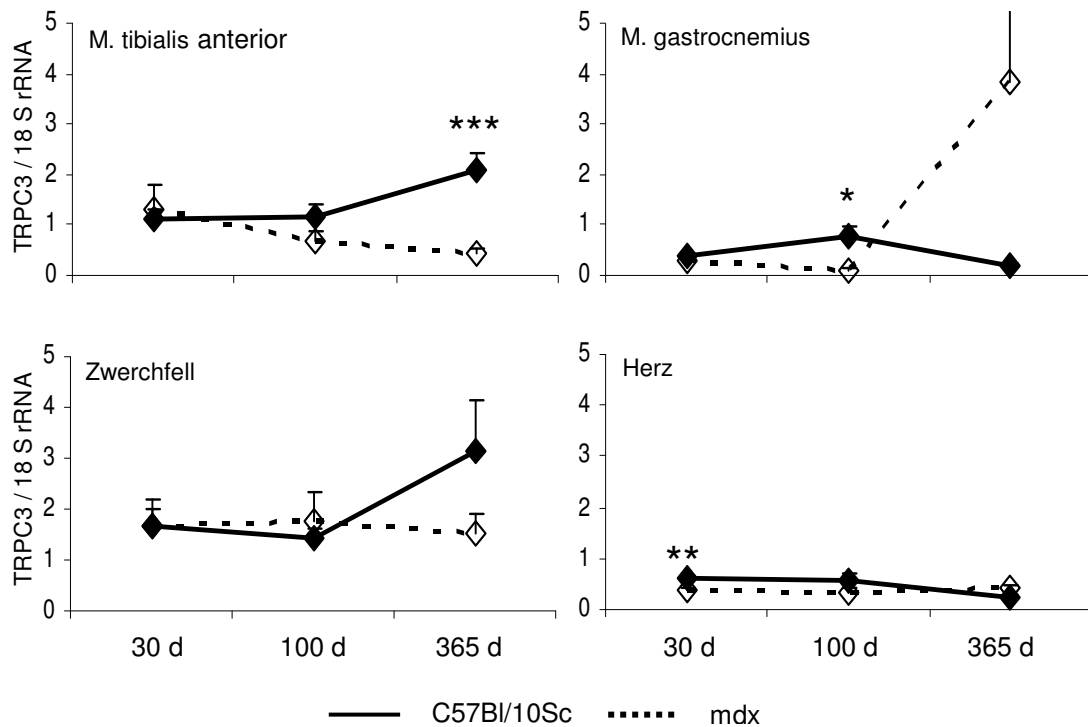
##### **4.3.1.1 Quantifizierung der mRNA von TRPC3**

Die Ergebnisse für die mRNA Expressionen von TRPC3 sind in der Abb. 14 dargestellt. Im Musculus tibialis anterior von Kontrolltieren stieg die mRNA-Quantität altersabhängig von 30 d bis 365 d an. Im Vergleich dazu verringerte sich, bei gleichem Ausgangswert beginnend, die mRNA-Menge bei mdx-Mäusen kontinuierlich, so dass bei einem Alter von 365 d eine signifikante Reduktion der mRNA-Menge in den mdx-Tieren vorlag.

Im Musculus gastrocnemius von Kontrolltieren entsprach die mRNA-Quantität von TRPC3 etwa der Hälfte der Menge im Tibialismuskel. Die Expression stieg bei 100 d alten C57Bl/10Sc-Mäusen leicht an und fiel dann bis zur Altersstufe von 365 d ab. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde bei 100 d alten mdx-Mäusen ein signifikant verringerter mRNA-Level gefunden.

Im Zwerchfell lag die Expression von TRPC3 in Kontrolltieren und mdx-Mäusen auf etwa gleichem Level wie im Tibialismuskel, ohne dass sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Tierstämmen zeigten.

Im Herz von Kontrolltieren war die mRNA-Menge von TRPC3 etwa halbiert gegenüber der Menge im Musculus tibialis anterior und blieb über die Zeit auf konstantem Niveau. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde bei den mdx-Mäusen bei einer Altersstufe von 30 d eine verringerte mRNA-Menge gefunden.



**Abb. 14: Quantifizierung der mRNA-Menge von TRPC3 in Muskelgeweben von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Der quantitative Nachweis von TRPC3-mRNA erfolgte im Musculus tibialis anterior, Musculus gastrocnemius, Zwerchfell und Herz von 30 d, 100 d und 365 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels „Real-time“ RT-PCR. Die erhaltenen Kopienzahlen wurden ins Verhältnis zu der Kopienzahl der 18S rRNA gesetzt und mit 1000 multipliziert. Von  $n = 6 - 10$  unabhängigen Quotienten wurde der Mittelwert  $\pm$  SEM gebildet und statistische Unterschiede unter Verwendung des *t*-Tests ermittelt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

#### 4.3.1.2 Quantifizierung des TRPC3-Proteins

Um nicht nur die mRNA-Quantität sondern auch die daraus entstehende Protein-Menge zu analysieren, wurden die Protein-Elektrophorese und der anschließende Western Blot durchgeführt. Dafür wurden die Proteine, wie im Abschnitt 3.2.11 beschrieben, aus Musculus tibialis anterior, Zwerchfell und Gehirn sowie aus der Niere isoliert und die Extrakte für die Analyse verwendet, wobei Gehirn und Niere als Positivkontrollen dienten. Die Ergebnisse für TRPC3 sind in der Abbildung 15 dargestellt. Die anschließende Quantifizierung aller immunreaktiven Banden für TRPC3 wurde in einer Grafik dargestellt (Abb. 15, rechte Spalte). Ein positiver Nachweis für TRPC3 sollte sich durch dunkle Banden bei einem theoretisch ermittelten Molekulargewicht von ca. 95 kDa zeigen.

Es waren aber, laut Literatur, auch immunreaktive Banden bei einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa zu erwarten, wobei wahrscheinlich Spaltprodukte von TRPC3 detektiert werden.

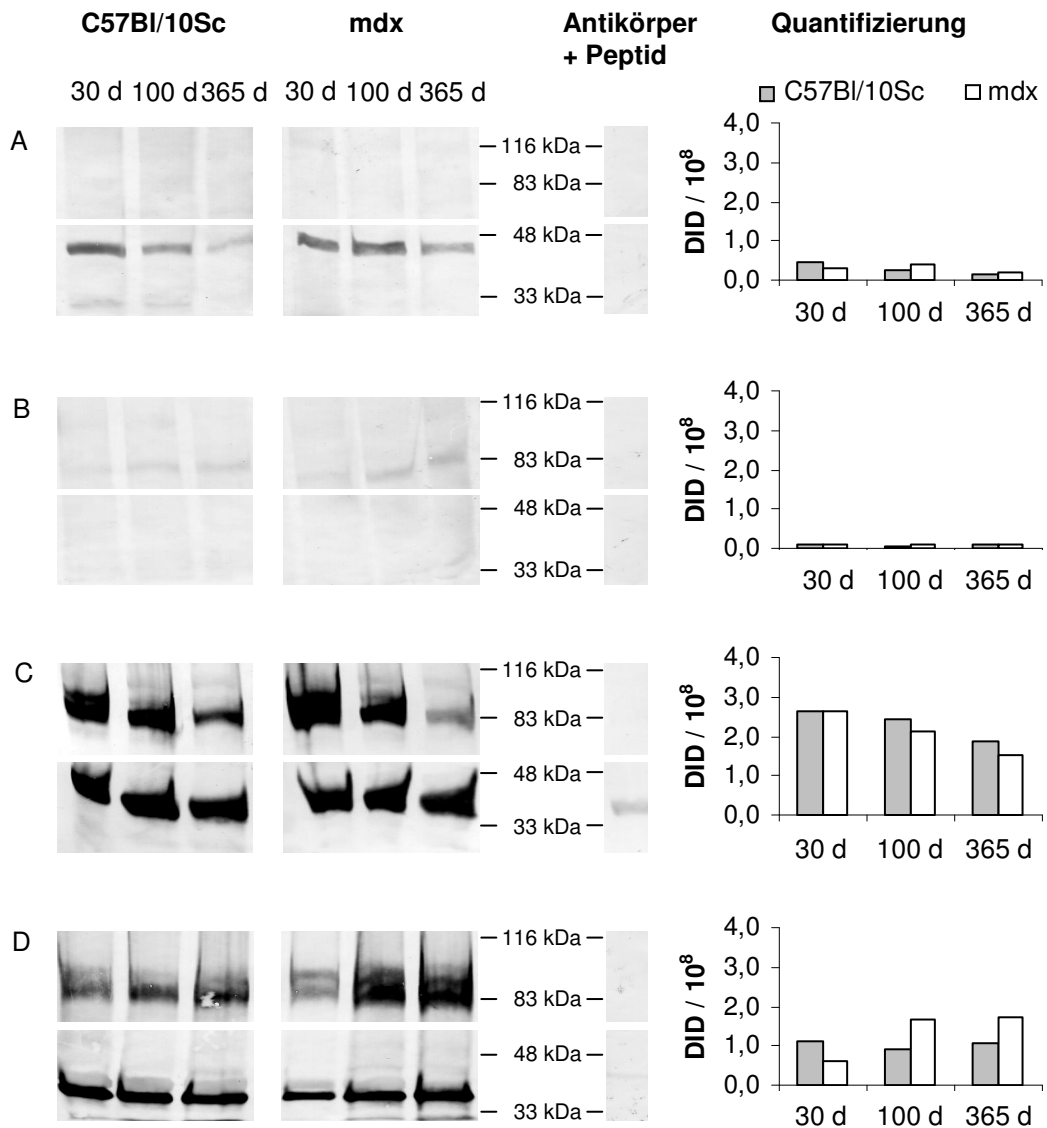
Das Gehirn (Abb. 15 A) eignete sich besonders gut als Positivkontrolle. Hier wurden in den Kontroll- und mdx-Mäusen positive Nachweise für TRPC3 durch immunreaktive Banden bei einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa gefunden. Die Spezifität des 1. Antikörpers wurde dadurch nachgewiesen, dass der Antikörper mit dem spezifischen Antigen vorinkubiert und anschließend genauso und zeitgleich verwendet wurde, wie die unbehandelten Antikörper.

Als weitere Positivkontrolle diente die TRPC3-Proteinexpression in der Niere (Abb. 15 B). In den Kontroll- sowie in den mdx-Mäusen wurden positive Banden bei einem Molekulargewicht von etwa 90 kDa detektiert und mittels Negativkontrolle als spezifisch klassifiziert.

Im Tibialisimuskel (Abb. 15 C) und im Zwerchfell (Abb. 15 D) von Kontroll- und mdx-Mäusen wurden immunreaktive Banden bei Molekulargewichten von etwa 45 kDa und 90 kDa nachgewiesen. Die Quantifizierung zeigte im Tibialisimuskel von Kontrolltieren eine abnehmende Protein-Menge von TRPC3 über die Zeit. Beim Vergleich der Proteinmengen zwischen beiden Tierstämmen wurden bei 30 d alten Tieren keine Unterschiede gefunden, während bei den älteren mdx-Mäusen eine verringerte Protein-Menge um etwa 1/10 detektiert wurde. Im Zwerchfell wurde TRPC3 in den Kontrolltieren zu allen Alterstufen etwa konstant exprimiert. Im Vergleich dazu zeigte die quantitative Analyse bei 30 d alten mdx-Mäusen eine um etwa 1/3 reduzierte Protein-Menge, während bei 100 d und 365 d alten mdx-Mäusen eine um ca. 1/3 erhöhte Protein-Menge gefunden wurde.

Zusammenfassend blieben die Proteinmengen im Muskelgewebe von Kontroll- und mdx-Mäusen jedoch auf etwa ähnlichem Niveau.





**Abb. 15: Western Blot und Quantifizierung des TRPC3-Proteins**

Die Analyse erfolgte mit Proteinextrakten von Gehirn (A), Niere (B), Musculus tibialis anterior (C) und Zwerchfell (D) von 30 d, 100 d und 365 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels Protein-Elektrophorese und Western Blot. Die Spezifität des TRPC3-Antikörpers wurde durch Inkubation mit dem spezifischen Peptid nachgewiesen. Die Quantifizierung aller immunreaktiven Banden erfolgte durch Intensitätsbestimmung (DID) derer mittels „GelScan-Programm“.

#### 4.3.1.3 Lokalisation von TRPC3 in Gewebeschnitten

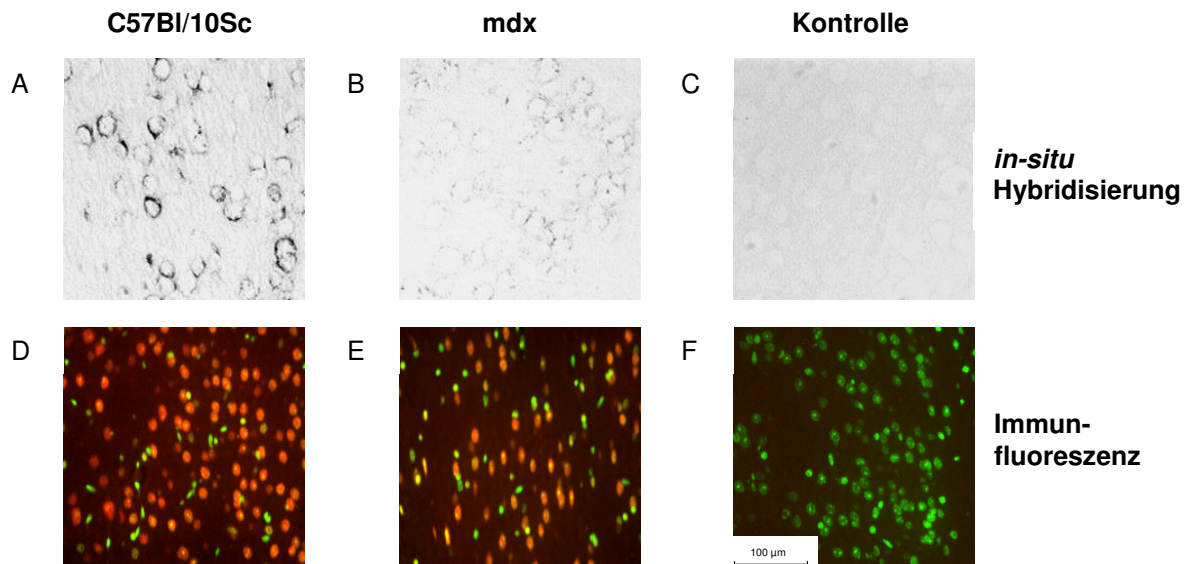
Um die mRNA spezifisch in Gewebeschnitten zu lokalisieren, wurde die *in-situ* Hybridisierung (siehe Abschnitt 3.2.14) durchgeführt. Die Lokalisation des Proteins erfolgte mittels der Immunfluoreszenz-Technik (siehe Abschnitt 3.2.15). Alle Analysen wurden mit Gewebeschnitten von identischen Paraffinblöcken von Gehirn, Niere, Herz, Musculus tibialis anterior und Zwerchfell von 30 d, 100 d und 365 d alten Kontroll- und mdx-Mäusen in einer Serie durchgeführt. Die Gewebeschnitte von Gehirn und Niere dienten, wie schon bei den vorherigen Experimenten, als Positivkontrollen.

Die histologischen Untersuchungen von Gehirn, Herz und Niere ergaben, wie zu erwarten war, keine Veränderungen zwischen Kontroll- und mdx-Mäusen. Im Vergleich zum Muskelgewebe der Kontrolltiere zeigten sich bei 30 d alten mdx-Mäusen bereits einige regenerierte Muskelfasern mit charakteristischen zentralen Zellkernen. Bei 100 d alten mdx-Mäusen hatte der Anteil der regenerierten Muskelfasern deutlich zugenommen, wobei aber auch Muskelfasern mit randständigen Zellkernen sichtbar waren. Des Weiteren wurden auch einkernige Zellen beobachtet. Im Alter von 365 d waren im Muskelgewebe der mdx-Mäuse fast alle Muskelfasern durch regenerierte Fasern, d.h. Fasern mit zentralen Zellkernen, ersetzt worden. Zusätzlich wurden im Zwerchfell zu diesem Zeitpunkt deutliche Bindegewebs- und Fetteinlagerungen, Zelldeformationen sowie Gewebsnekrosen beobachtet.

Im Vergleich zu den morphologischen Betrachtungen konnten für die Lokalisationen der TRP-Ionenkanäle keine Unterschiede in den Geweben der Kontroll- und mdx-Mäuse zwischen den verschiedenen Altersstufen festgestellt werden. Daher wird in den nachfolgenden Abschnitten nur die Lokalisation der TRP-Kanäle bei 100 d alten Tieren näher besprochen.

In Gewebeschnitten des Gehirns von Kontrolltieren wurden mittels *in-situ* Hybridisierung mit der TRPC3-Antisense-cRNA-Sonde positive Nachweise für TRPC3-mRNA durch dunkle Anfärbung der neuronalen Zellen der Lamina molecularis, Lamina granularis externa und Lamina pyramidalis externa der Grosshirnrinde gefunden (Abb. 16 A). In den mdx-Mäusen wurde die TRPC3-mRNA ebenfalls in den drei Schichten der Grosshirnrinde detektiert (Abb. 16 B). Die *in-situ* Hybridisierung mit der Sense-cRNA-Sonde zeigte dagegen keine spezifische Anfärbung (Abb. 16 C). In der Grosshirnrinde von 100 d alten Kontrollmäusen wurde das TRPC3-Protein durch eine spezifische rote Fluoreszenz des zweiten Antikörpers *Anti-Rabbit IgG Alexa 568* ebenfalls in den neuronalen Zellen der Lamina molecularis, Lamina granularis externa und Lamina pyramidalis externa detektiert, während die Zellkerne grün erschienen. Co-Lokalisationen des TRPC3-Proteins mit Zellkernen erschienen gelb (Abb. 16 D).

Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurden in den mdx-Mäusen keine Veränderungen in der Lokalisation von TRPC3 gefunden (Abb. 16 E). Die Kontrolle zeigte keinen spezifischen Nachweis für TRPC3 (Abb. 16 F).



**Abb. 16: Lokalisation der mRNA und des TRPC3-Proteins in Gewebeschnitten der Grosshirnrinde**

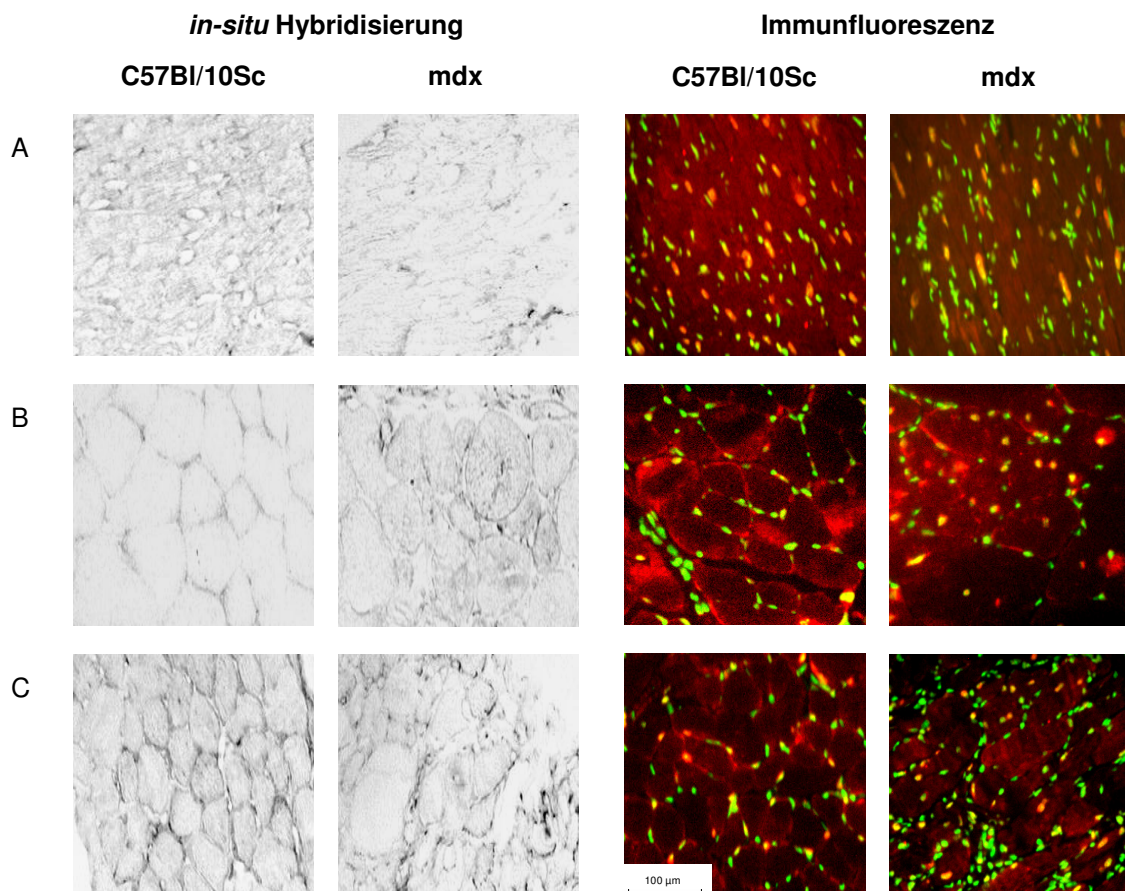
A – C: Die Lokalisation der mRNA erfolgte im Grosshirn von 100 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels *in-situ* Hybridisierung, wobei eine Sondenhybridisierung mit der Antisense-cRNA-Sonde in einer Sekundärreaktion dunkle Anfärbungen hervorrief (A, B). Die Negativkontrolle erfolgte mit der Sense-cRNA-Sonde (C).

D – F: Das TRPC3-Protein wurde in 100 d alten C57Bl/10Sc- (D) und mdx-Mäusen (E) durch eine rote Fluoreszenz des spezifisch gebundenen zweiten Antikörpers *Anti-Rabbit IgG Alexa 568* nachgewiesen. Zusätzlich erfolgte eine Anfärbung der Zellkerne mit *Sytox@Green*, wobei eine Co-Lokalisation von Protein und Zellkern gelb erschien. Die Negativkontrolle erfolgte mit dem Peptid-blockierten Antikörper (F).

Die Lokalisation von TRPC3 im Muskelgewebe war von besonderem Interesse, daher wurde die *in-situ* Hybridisierung und die Immunfluoreszenz an Gewebequerschnitten von Herz, Musculus tibialis anterior und Zwerchfell von Kontroll- und mdx-Mäusen durchgeführt. In den Gewebeschnitten von Herz wurden für Kontrolltiere und auch für mdx-Mäuse positive Nachweise für die mRNA und das Protein von TRPC3 in Strukturen gefunden, bei denen es sich wahrscheinlich um Kardiomyozyten handelt (Abb. 17 A).

Im Musculus tibialis anterior (Abb. 17 B) und auch im Zwerchfell (Abb. 17 C) von Kontrolltieren konnte sowohl die mRNA als auch das Protein von TRPC3 in Muskelfasern vor allem perinukleär und sarkolemmal lokalisiert werden, wobei das Sarkolemm manchmal komplett und manchmal nur teilweise angefärbt war.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde TRPC3 in den mdx-Mäusen nur vereinzelt sarkolemmal lokalisiert. Die mRNA und das TRPC3-Protein wurden bei den mdx-Mäusen vor allem perinukleär lokalisiert, wobei TRPC3 in den regenerierenden Muskelfasern auf Grund der zentralen Zellkerne gleichzeitig zytosolisch aufgefunden wurde. Die Co-Lokalisation von Zellkern und TRPC3-Protein wurde durch eine gelbe Färbung sichtbar, wobei die proteinspezifische rote Fluoreszenz weiter ins Zytosol reichte. In den mdx-Mäusen wurden weiterhin positive Nachweise für TRPC3 in den einkernigen Muskelzellen gefunden (nicht gezeigt).



**Abb. 17: Lokalisation der mRNA und des TRPC3-Proteins in Muskelquerschnitten von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Die Lokalisation der mRNA und des Proteins erfolgte in Querschnitten von Herz (A), Musculus tibialis anterior (B) und Zwerchfell (C) von 100 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels *in-situ* Hybridisierung und Immunfluoreszenz. Spezifische Nachweise für TRPC3 zeigten sich bei der *in-situ* Hybridisierung durch dunkle Anfärbungen und in der Immunfluoreszenz durch eine rote Fluoreszenz. Co-Lokalisationen zwischen Protein (rot) und Zellkern (grün) erschienen von gelber Farbe.

Die Analysen der Expression von TRPC3 im Muskelgewebe von mdx-Mäusen ergaben im Vergleich zu den Kontrolltieren keine wesentlichen Änderungen. Die *in-situ* Hybridisierung und die Immunfluoreszenz zeigten im Gewebe von Kontrolltieren eine sarkolemmale Lokalisation von TRPC3, während in mdx-Mäusen TRPC3 eher zytosolisch nachgewiesen wurde.

#### **4.3.2 Analyse von TRPC6**

Ein weiterer dominanter Ionenkanal im Muskelgewebe war TRPC6, welcher weitergehend analysiert wurde.

##### **4.3.2.1 Quantifizierung der mRNA von TRPC6**

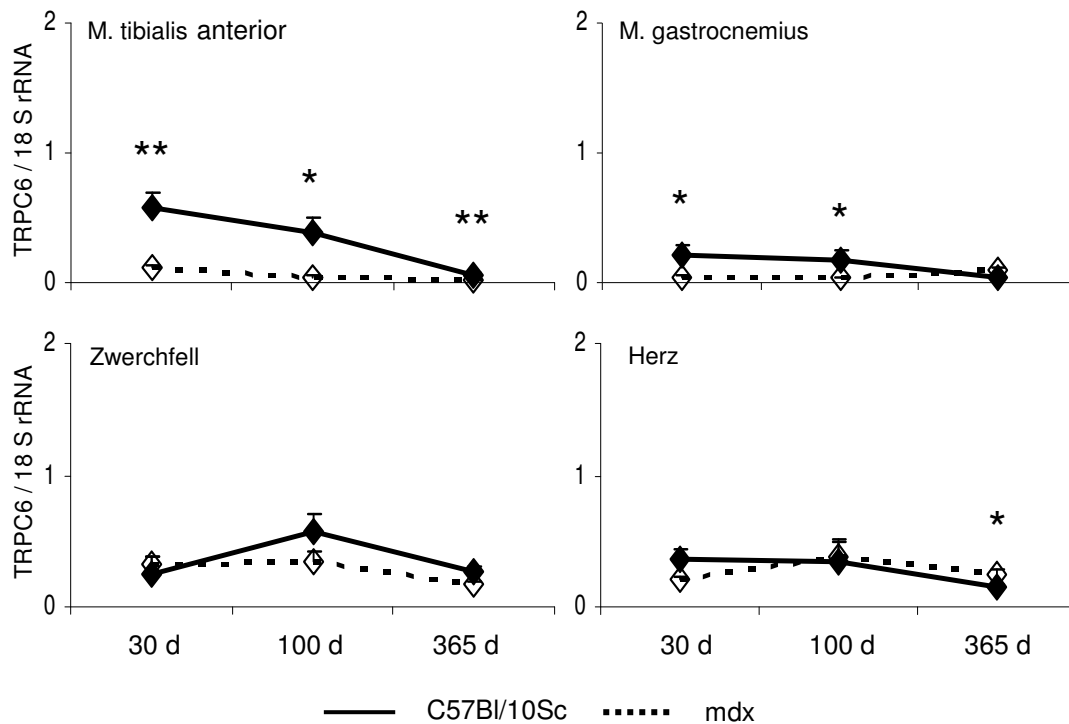
Für den Nachweis der mRNA-Quantität von TRPC6 dienten die gleichen cDNAs wie für die Analyse von TRPC3. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt.

Im Musculus tibialis anterior von 30 d alten Kontrolltieren lag die mRNA von TRPC6 auf etwa halbem Niveau von TRPC3. Bis zum Zeitpunkt von 365 d verringerte sich diese Menge kontinuierlich auf ein Zehntel. Im Vergleich zu den Kontrollen war die mRNA-Quantität in mdx-Mäusen zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant reduziert.

Im Musculus gastrocnemius von Kontrolltieren wurde die TRPC6-mRNA etwa 2/3 weniger exprimiert als im Tibialis-muskel. Mit zunehmendem Alter der Tiere verringerte sich die mRNA von TRPC6 kontinuierlich. Im Vergleich zu den Kontrolltieren lag die Expression bei 30 d und bei 100 d alten Mutanten signifikant niedriger.

Im Zwerchfell war der Level der mRNA von TRPC6 etwa zwischen den Niveaus der beiden bisher betrachteten Muskeln. Über die Zeit und auch im Vergleich der Kontrollen zu mdx-Mäusen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Im Herzmuskel von Kontrolltieren war das Niveau von TRPC6-mRNA etwa wie im Zwerchfell. Der Level halbierte sich in Kontrolltieren mit zunehmendem Alter. Im Vergleich zu den Kontrollen wurde bei den mdx-Mäusen nur zum Zeitpunkt von 365 d eine geringe, aber signifikant höhere Expression von TRPC6 registriert.



**Abb. 18: Quantifizierung der mRNA-Menge von TRPC6 in Muskelgeweben von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Der quantitative Nachweis von TRPC6 erfolgte im Musculus tibialis anterior, Musculus gastrocnemius, Zwerchfell und Herz von 30 d, 100 d und 365 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels „Real-time“ RT-PCR. Die erhaltenen Kopienzahlen wurden ins Verhältnis zu der Kopienzahl der 18S rRNA gesetzt und mit 1000 multipliziert. Von  $n = 6 - 10$  unabhängigen Quotienten wurde der Mittelwert  $\pm$  SEM gebildet und statistische Unterschiede unter Verwendung des *t-Tests* ermittelt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

#### 4.3.2.2 Quantifizierung des TRPC6-Proteins

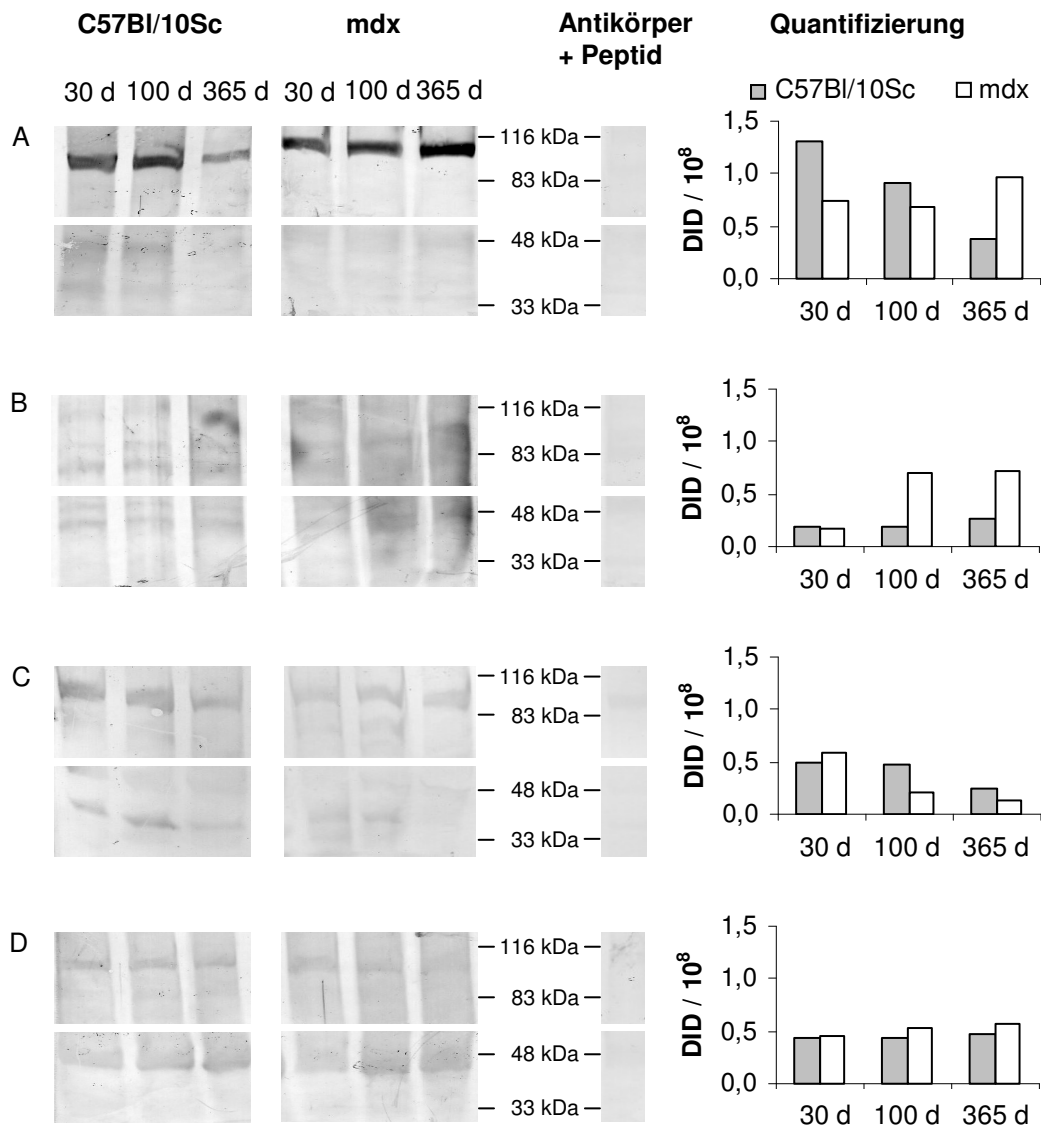
Bei der quantitativen Analyse des TRPC6-Proteins (Abb. 19) mittels Protein-Elektrophorese und Western Blot wurden die gleichen Gewebeextrakte wie zuvor zum Nachweis von TRPC3 verwendet. Beim Nachweis dieses Proteins sollten theoretisch immunreaktive Banden bei Molekulargewichten von 106 kDa und laut Literatur von 45 kDa entstehen.

In der ersten Positivkontrolle, dem Gehirn, wurde das TRPC6-Protein in Kontroll- und mdx-Mäusen durch positive Nachweise in Form von dunklen Banden bei einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa gefunden (Abb. 19 A). Durch den Western Blot mit dem blockierten Antikörper konnte die Spezifität der immunreaktiven Banden für TRPC6-Protein nachgewiesen werden.

In der Niere (Abb. 19 B) wurden schwache immunreaktive Banden bei einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa und zusätzlich bei 100 d und 365 d alten mdx-Mäusen auch bei ca. 100 kDa gefunden. Von Bedeutung ist für uns jedoch die Proteinexpression im Muskelgewebe.

Im Tibialisimuskel (Abb. 19 C) aber auch im Zwerchfell (Abb. 19 D) von Kontroll- und mdx-Mäusen wurden immunreaktive Banden bei Molekulargewichten von sowohl 45 kDa als auch 100 kDa erhalten. Die quantitative Analyse derer ergab im Tibialisimuskel von Kontrolltieren eine Abnahme der Proteinexpression um etwa die Hälfte mit zunehmendem Alter der Tiere. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurden bei 30 d alten mdx-Mäusen keine Unterschiede in der Proteinexpression von TRPC6 gefunden. Bei 100 d und bei 365 d alten mdx-Mäusen wurde nur die Hälfte der Protein-Menge von den Kontrolltieren detektiert.

Die Quantifizierung der Protein-Mengen im Zwerchfell zeigte eine konstante Proteinexpression in Kontrolltieren über die Zeit. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurden in den mdx-Mäusen keine Unterschiede gefunden.



**Abb. 19: Western Blot und Quantifizierung des TRPC6-Proteins**

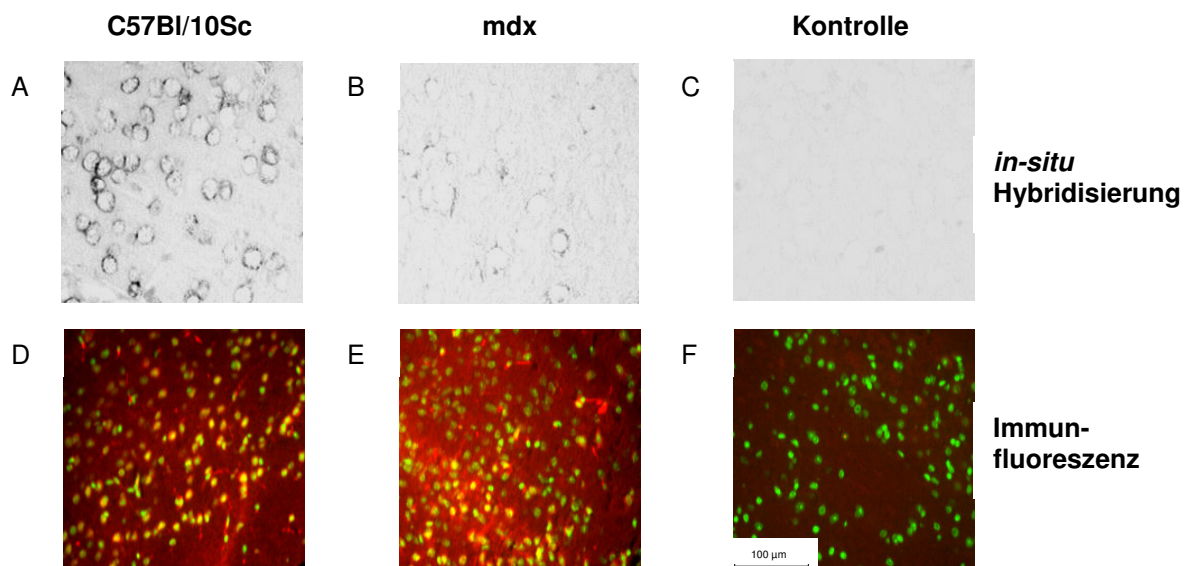
Die Analyse erfolgte mit Proteinextrakten von Gehirn (A), Niere (B), Musculus tibialis anterior (C) und Zwerchfell (D) von 30 d, 100 d und 365 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels Protein-Elektrophorese und Western Blot. Die Spezifität des TRPC6-Antikörpers wurde durch Inkubation mit dem spezifischen Peptid nachgewiesen. Die Quantifizierung aller immunreaktiven Banden erfolgte durch Intensitätsbestimmung (DID) mittels „GelScan-Programm“.



#### 4.3.2.3 Lokalisation von TRPC6 in Gewebeschnitten

Die für die Lokalisation von TRPC3 verwendeten Gewebe dienten auch dem Nachweis von TRPC6, wobei die Region des Grosshirns als Positivkontrolle fungierte. Im Gehirn von Kontroll- und mdx-Mäusen wurde sowohl die mRNA, als auch das Protein von TRPC6 in den neuronalen Zellen in der Lamina molecularis, Lamina granularis externa und Lamina pyramidalis externa der Grosshirnrinde gefunden.

Während die mRNA durch dunkle Anfärbungen (Abb. 20 A, B) visualisiert wurde und die *in-situ* Hybridisierung mit der Sense-cRNA-Sonde keine Anfärbung hervorrief (Abb. 20 C), konnte das spezifische Protein durch eine rote Fluoreszenz des zweiten Antikörpers nachgewiesen werden (Abb. 20 D, E). Co-Lokalisationen von TRPC6-Protein mit Zellkernen (grün) erschienen von gelber Farbe. Die Kontrolle bei der Immunfluoreszenz wies keine spezifische rote Fluoreszenz auf (Abb. 20 F).



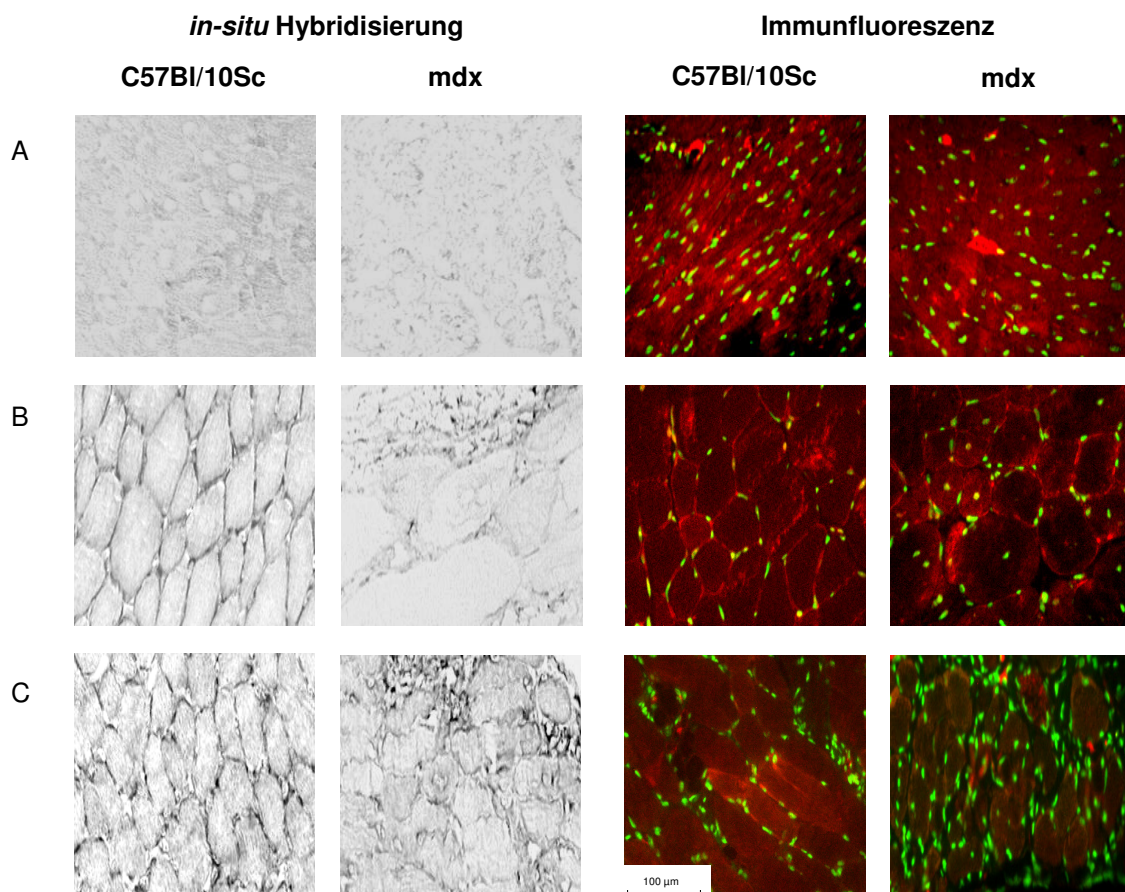
**Abb. 20: Lokalisation der mRNA und des TRPC6-Proteins in Gewebeschnitten der Grosshirnrinde**

A – C: Die Lokalisation der mRNA erfolgte im Grosshirn von 100 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels *in-situ* Hybridisierung, wobei eine Sondenhybridisierung mit der Antisense-cRNA-Sonde in einer Sekundärreaktion dunkle Anfärbungen hervorrief (A, B). Die Negativkontrolle erfolgte mit der Sense-cRNA-Sonde (C).

D – F: Das TRPC6-Protein wurde in 100 d alten C57Bl/10Sc- (D) und mdx-Mäusen (E) durch eine rote Fluoreszenz des spezifisch gebundenen zweiten Antikörpers *Anti-Rabbit IgG Alexa 568* nachgewiesen. Zusätzlich erfolgte eine Anfärbung der Zellkerne mit „*Sytox@Green*“, wobei eine Co-Lokalisation von Protein und Zellkern gelb erschien. Die Negativkontrolle erfolgte mit dem Peptid-blockierten Antikörper (F).

Im Zusammenhang mit der Muskeldystrophie war die Lokalisation von TRPC6 im Muskelgewebe von besonderem Interesse. Im Herz von Kontroll- und mdx-Mäusen konnte TRPC6 durch Anfärbungen, wahrscheinlich der Kardiomyozyten, nachgewiesen werden (Abb. 21 A).

Im Muskulus tibialis anterior (Abb. 21 B) und Zwerchfell (Abb. 21 C) von Kontrolltieren wurde die mRNA und das TRPC6-Protein perinukleär und sarkolemmal in den Muskelfasern lokalisiert. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde TRPC6 in mdx-Mäusen schwächer im Sarkolemm gefunden. Zusätzlich konnte TRPC6 um die typisch zentral gelegenen Zellkerne, d. h. im Zytosol von Muskelfasern sowie in den einkernigen Muskelzellen detektiert werden.



**Abb. 21: Lokalisation der mRNA und des TRPC6-Proteins in Muskelquerschnitten von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Die Lokalisation der mRNA und des Proteins erfolgte in Querschnitten von Herz (A), Musculus tibialis anterior (B) und Zwerchfell (C) von 100 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels *in-situ* Hybridisierung und Immunfluoreszenz. Spezifische Nachweise für TRPC6 zeigten sich bei der *in-situ* Hybridisierung durch dunkle Anfärbungen und in der Immunfluoreszenz durch eine rote Fluoreszenz. Co-Lokalisationen zwischen Protein (rot) und Zellkern (grün) erschienen von gelber Farbe.

Die Analysen im Muskelgewebe zeigten im Vergleich zu der Expression in den Kontrolltieren eine Reduktion von TRPC6 in den mdx-Mäusen. Im Muskelgewebe von Kontrolltieren konnte TRPC6 perinukleär und sarcolemmal von den Muskelfasern lokalisiert werden, während bei den mdx-Mäusen TRPC6 deutlich weniger sarcolemmal, dafür aber auch perinukleär um die charakteristischen zentralen Zellkerne gefunden wurde.

### **4.3.3 Analyse von TRPV4**

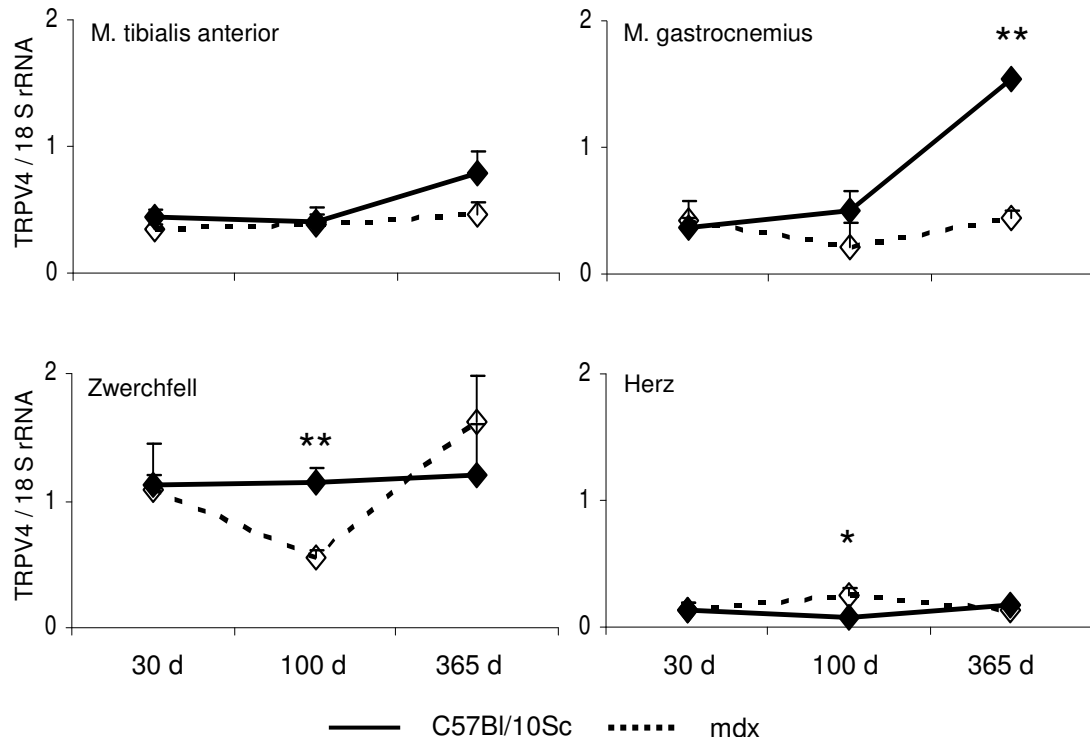
#### **4.3.3.1 Quantifizierung der mRNA von TRPV4**

Die Quantifizierung der mRNA-Mengen von TRPV4 im Musculus tibialis anterior, Musculus gastrocnemius, Zwerchfell und Herz zu den verschiedenen Altersstufen sind in der Abb. 22 dargestellt. Die TRPV4-mRNA wurde im Musculus tibialis anterior von Kontrolltieren etwas geringfügiger exprimiert gefunden als die von TRPC6. Die mRNA-Quantität blieb über die Zeit in etwa konstant. Zwischen Kontrollen und mdx-Mäusen wurden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen.

Ähnlich war das Expressionsschema im Musculus gastrocnemius. Bei einer Altersstufe von 365 d wurde bei den Kontrolltieren eine vermehrte mRNA-Menge gegenüber dem Anfangslevel gefunden. Im Vergleich zu den Kontrollen blieb, bei gleichem Ausgangswert beginnend, der mRNA-Level in den mdx-Mäusen über die Zeit nahezu konstant, so dass dies zum Zeitpunkt von 365 d eine signifikant geringere mRNA Expression in den mdx-Mäusen zur Folge hatte.

Im Zwerchfell von Kontrolltieren lag die mRNA-Menge von TRPV4 zu allen drei Zeitpunkten auf konstantem Level. Beim Vergleich der mRNA-Quantitäten in mdx-Mäusen zu der in Kontrolltieren zeigte sich nur zum Zeitpunkt von 100 d eine Halbierung der mRNA Expression.

Deutlich weniger TRPV4 wurde im Herzmuskel von Kontrolltieren gefunden. Im Vergleich zu den Kontrollen war die mRNA in mdx-Mäusen zum Zeitpunkt von 100 d geringfügig, dennoch signifikant erhöht.



**Abb. 22: Quantifizierung der mRNA-Menge von TRPV4 in Muskelgeweben von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

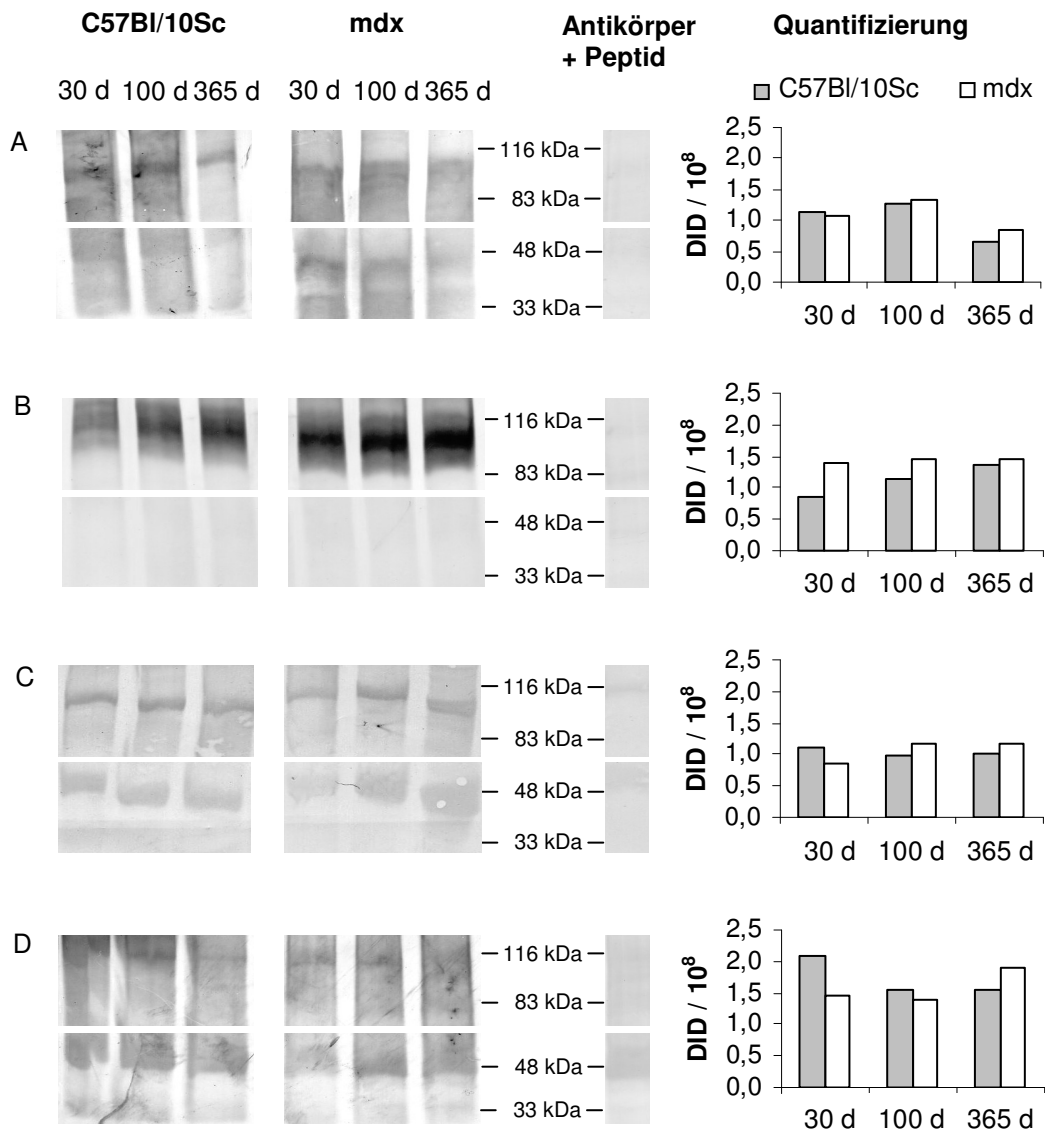
Der quantitative Nachweis von TRPV4-mRNA erfolgte im Musculus tibialis anterior, Musculus gastrocnemius, Zwerchfell und Herz von 30 d, 100 d und 365 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels „Real-time“ RT-PCR. Die erhaltenen Kopienzahlen wurden ins Verhältnis zu der Kopienzahl der 18S rRNA gesetzt und mit 1000 multipliziert. Von  $n = 6 - 10$  unabhängigen Quotienten wurde der Mittelwert  $\pm$  SEM gebildet und statistische Unterschiede unter Verwendung des *t-Tests* ermittelt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

#### 4.3.3.2 Quantifizierung des TRPV4-Proteins

Der Nachweis für das TRPV4-Protein wurde mittels Protein-Elektrophorese und Western Blot durchgeführt und die Ergebnisse in der Abb. 23 dargestellt. Aus der Datenbank „ExPASy Proteomics Server“ ging hervor, dass für TRPV4 eine immunreaktive Bande bei einem Molekulargewicht von 98 kDa zu erwarten sein sollten. Es sind aber auch positive Resultate in Form von dunklen Banden bei einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa möglich.

Im Gehirn (Abb. 23 A) von Kontroll- und mdx-Mäusen konnten immunreaktive Banden sowohl bei etwa 48 kDa, als auch bei ca. 100 kDa erhalten werden, während in der Niere (Abb. 23 B) von beiden Tierstämmen TRPV4 durch starke dunkle Banden bei etwa 100 kDa nachgewiesen wurde. In den Negativkontrollen wurden keine Nachweise für TRPV4 erhalten, was zeigte, dass die erhaltenen Banden spezifisch für TRPV4 waren. Im Musculus tibialis anterior (Abb. 23 C) und im Zwerchfell (Abb. 23 D) wurden für beide Tierstämme immunreaktive Banden bei 48 kDa und ca. 100 kDa gefunden.

Die anschließenden quantitativen Analysen der Banden vom Tibialismuskel und Zwerchfell ergaben eine relativ konstante Proteinmenge von TRPV4 in den Kontrolltieren bei allen drei Altersstufen. Im Vergleich zu den Kontrolltieren konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Proteinexpression von TRPV4 in mdx-Mäusen gefunden werden.



**Abb. 23: Western Blot und Quantifizierung des TRPV4-Proteins**

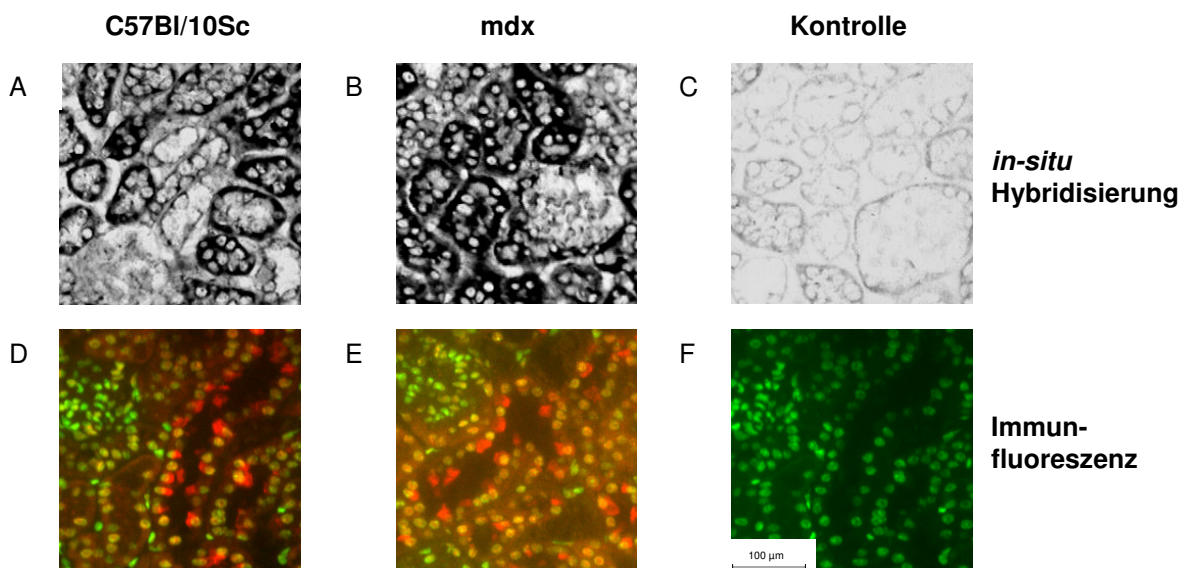
Die Analyse erfolgte mit Proteinextrakten von Gehirn (A), Niere (B), Musculus tibialis anterior (C) und Zwerchfell (D) von 30 d, 100 d und 365 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels Protein-Elektrophorese und Western Blot. Die Spezifität des TRPV4-Antikörpers wurde durch Inkubation mit dem spezifischen Peptid nachgewiesen. Die Quantifizierung aller immunreaktiven Banden erfolgte durch Intensitätsbestimmung (DID) mittels „GelScan-Programm“.

#### 4.3.3.3 Lokalisation von TRPV4 in Gewebeschnitten

Für die Lokalisation von TRPV4 wurde als Positivkontrolle Nierengewebe verwendet. Die TRPV4-mRNA wurde in Kontroll- (Abb. 24 A) und mdx-Mäusen (Abb. 24 B) in der Zona glomerulosa des Cortex renalis luminal und apikal der Epithelzellen der distalen Tubuli lokalisiert. In den proximalen Tubuli wurde nur eine sehr schwache apikale Anfärbung der Epithelzellen beobachtet. Die Glomeruli zeigten ebenfalls schwache Anfärbungen.

Die Negativkontrolle stellte die Hybridisierung mit der Sense-cRNA-Sonde auf demselben Objektträger dar, welche keine spezifische Farbreaktion zeigte (Abb. 24 C).

Das Protein von TRPV4 wurde in beiden Tierstämmen (Abb. 24 D, E) sowohl in den proximalen, als auch in den distalen Tubuli gefunden. Hierbei erschien die Proteinspezifische rote Fluoreszenz in den distalen Tubuli eher mit den Zellkernen der Epithelzellen co-lokalisiert (rot / gelb) und in den proximalen Tubuli eher luminal. In den Glomeruli konnten nur wenige spezifische Anfärbungen beobachtet werden. Die Negativkontrolle zeigte keinen Nachweis für das TRPV4-Protein (Abb. 24 F).



**Abb. 24: Lokalisation der mRNA und des TRPV4-Proteins in Gewebeschnitten der Niere**

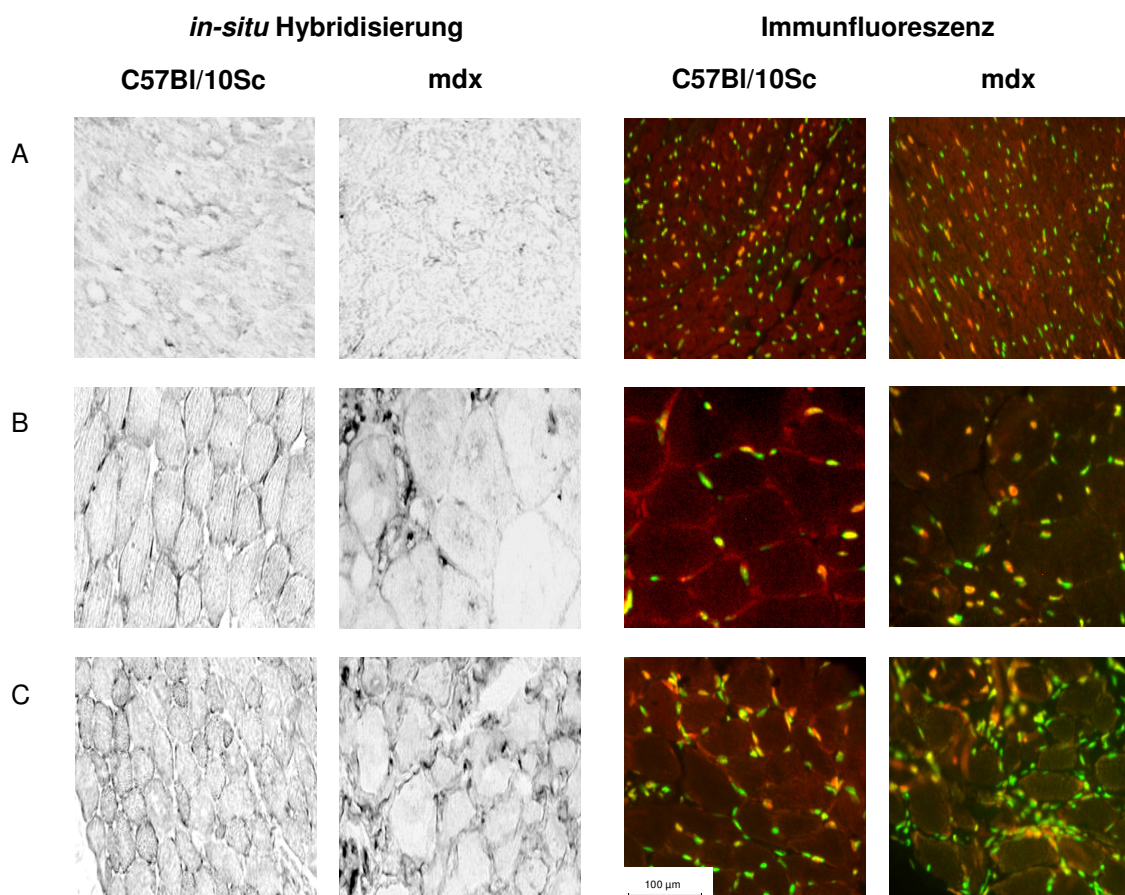
A – C: Die Lokalisation der mRNA erfolgte in der Niere von 100 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels *in-situ* Hybridisierung, wobei eine Sondenhybridisierung mit der Antisense-cRNA-Sonde in einer Sekundärreaktion dunkle Anfärbungen hervorrief (A, B). Die Negativkontrolle erfolgte mit der Sense-cRNA-Sonde (C).

D – F: Das TRPV4-Protein wurde in 100 d alten C57Bl/10Sc- (D) und mdx-Mäusen (E) durch eine rote Fluoreszenz des spezifisch gebundenen zweiten Antikörpers *Anti-Rabbit IgG Alexa 568* nachgewiesen. Zusätzlich erfolgte eine Anfärbung der Zellkerne mit „*Sytox@Green*“, wobei eine Co-Lokalisation von Protein und Zellkern gelb erschien. Die Negativkontrolle erfolgte mit dem Peptid-blockierten Antikörper (F).



Bei Betrachtung der Nachweisreaktionen im Muskelgewebe (Abb. 25) fielen diese deutlich schwächer als in der Niere aus. Im Herz von Kontroll- und mdx-Mäusen konnten Anfärbungen in Strukturen nachgewiesen werden, welche möglicherweise die Kardiomyozyten darstellten (Abb. 25 A).

In den Gewebequerschnitten des Musculus tibialis anterior (Abb. 25 B) und des Zwerchfells (Abb. 25 C) von Kontrolltieren konnte TRPV4 sarkolemmal und perinukleär in Muskelfasern gefunden werden. Dem Gegenüber wurde in mdx-Mäusen TRPV4 kaum sarkolemmal, dafür aber um die zentralen Zellkerne der regenerierenden Muskelfasern sowie in den einkernigen Zellen beobachtet.



**Abb. 25: Lokalisation der mRNA und des TRPV4-Proteins in Muskelquerschnitten von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Die Lokalisation der mRNA und des Proteins erfolgte in Querschnitten von Herz (A), Musculus tibialis anterior (B) und Zwerchfell (C) von 100 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels *in-situ* Hybridisierung und Immunfluoreszenz. Spezifische Nachweise für TRPV4 zeigten sich bei der *in-situ* Hybridisierung durch dunkle Anfärbungen und in der Immunfluoreszenz durch eine rote Fluoreszenz. Co-Lokalisationen zwischen Protein (rot) und Zellkern (grün) erschienen von gelber Farbe.

Im Muskelgewebe von Kontrollmäusen wurde eine annähernd gleiche Expression von TRPV4 bei allen drei Altersstufen nachgewiesen. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigten sich bei den mdx-Mäusen keine wesentlichen Unterschiede in der TRPV4 Expression. In Gewebeschnitten von Muskelgeweben der Kontrolltiere wurde TRPV4 sarkolemmal und perinukleär in den Muskelfasern gefunden. Bei den mdx-Mäusen konnte TRPV4 kaum sarkolemmal, aber dafür co-lokalisiert mit den zentralen Zellkernen detektiert werden.

#### **4.3.4 Analyse von TRPM7**

Von den TRP-Kanälen im Muskelgewebe war der dominanteste Vertreter TRPM7. Dieser Ionenkanal wurde im Folgenden näher analysiert.

##### **4.3.4.1 Quantifizierung der mRNA von TRPM7**

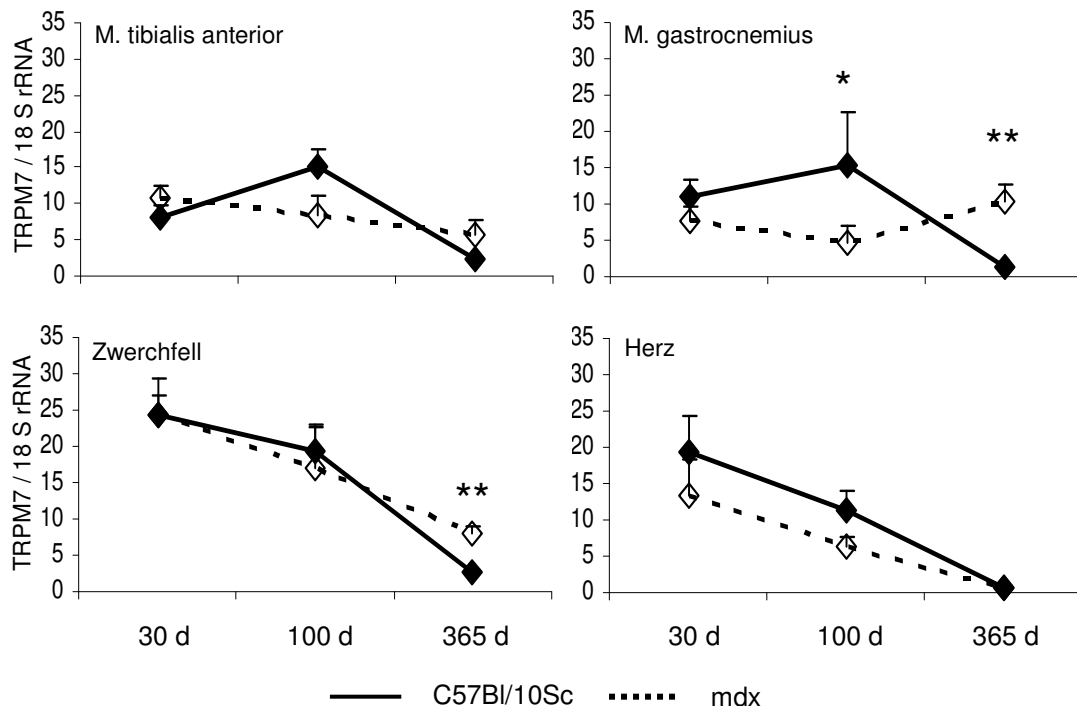
Die quantitative Analyse der mRNA Expression von TRPM7 ist in Abb. 26 dargestellt. Im Musculus tibialis anterior von Kontrolltieren lag der mRNA-Level bei einer Altersstufe von 30 d fast 10-fach höher als der Level von TRPC3. Bei einer Altersstufe von 100 d stieg die mRNA-Menge deutlich an und fiel bei noch älteren Tieren auf ca. die Hälfte des Ausgangswertes ab. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigten sich in den mdx-Mäusen keine signifikanten Unterschiede.

Ein ähnliches Expressionsmuster wurde im Musculus gastrocnemius von Kontrolltieren gefunden. Auch hier stieg die mRNA-Menge bei 100 d alten Kontrolltieren an und fiel bei 365 d alten Mäusen ab. Die mRNA-Quantität war bei 30 d alten mdx-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren in etwa gleich. Zum Zeitpunkt von 100 d betrug die mRNA-Menge in mdx-Mäusen nur noch 1/3 der Menge von Kontrolltieren. Von der Altersstufe von 100 d bis zu 365 d alten mdx-Mäusen stieg die mRNA-Menge von TRPM7 auf etwa das Doppelte an. Zum letzten Zeitpunkt lag die Expression von TRPM7 in den mdx-Mäusen 10-fach höher als in Kontrolltieren.

Im Zwerchfell von Kontrolltieren war die mRNA-Quantität zum Zeitpunkt von 30 d mehr als doppelt so hoch als im Tibialismuskel. In der weiteren Entwicklung der Tiere fiel der mRNA-Level drastisch auf etwa 1/10 des Ausgangswertes ab. Im Vergleich dazu fiel in mdx-Mäusen, bei gleichem Ausgangswert beginnend, der mRNA-Level etwas weniger stark auf etwa 1/5 des Ausgangswertes ab. Zum Zeitpunkt von 365 d lag somit die mRNA-Menge in den Mutanten signifikant höher als in Kontrolltieren.

Im Herz von Kontrolltieren lag die mRNA-Quantität auf etwas geringerem Niveau als im Zwerchfell und verringerte sich mit der Zeit kontinuierlich auf weniger als 1/20stel des Ausgangswertes. Im Vergleich zu der Expression in den Kontrolltieren wurden bei den mdx-Mäusen keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen.





**Abb. 26: Quantifizierung der mRNA-Menge von TRPM7 in Muskelgeweben von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

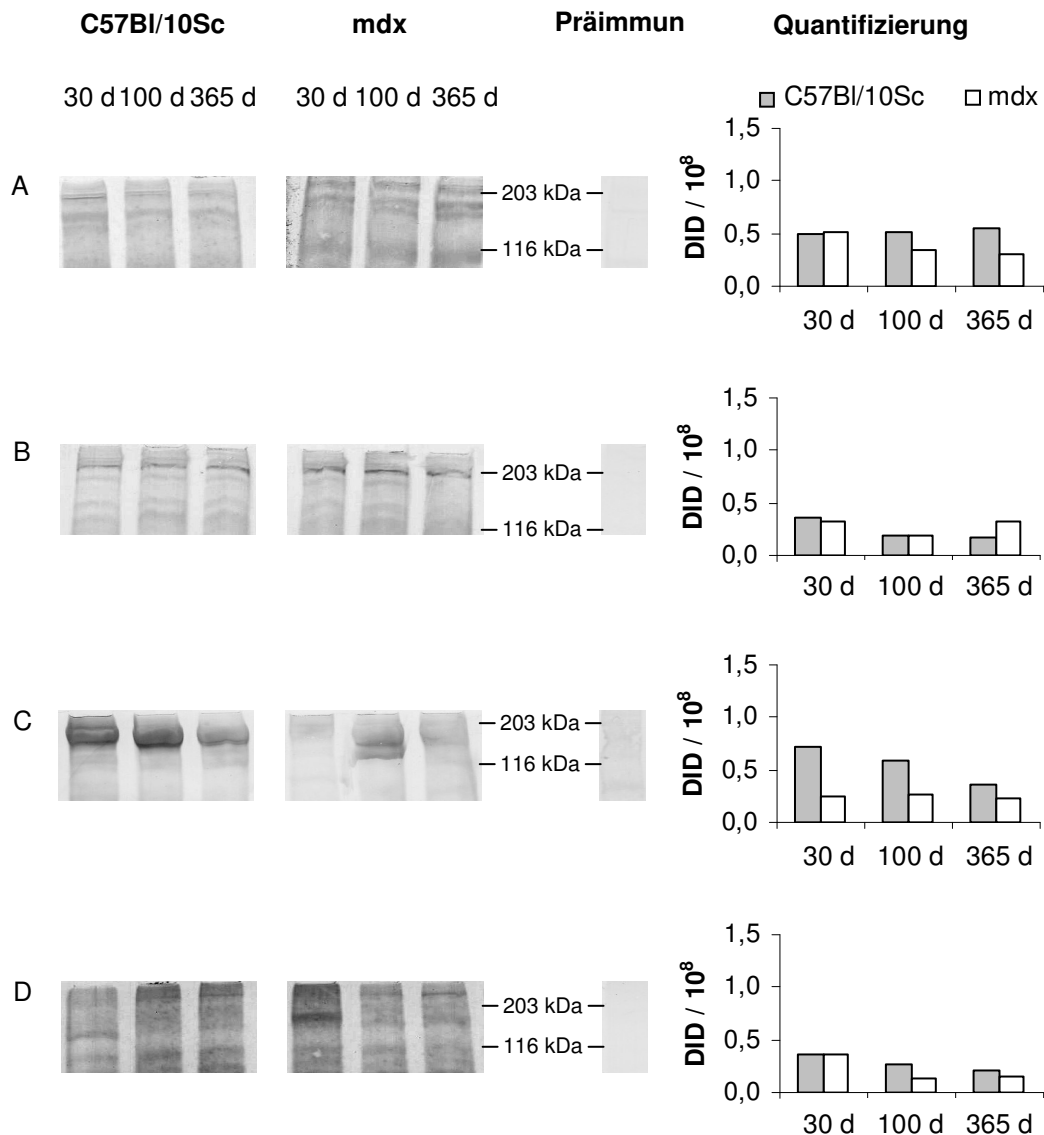
Der quantitative Nachweis von TRPM7-mRNA erfolgte im Musculus tibialis anterior, Musculus gastrocnemius, Zwerchfell und Herz von 30 d, 100 d und 365 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels „Real-time“ RT-PCR. Die erhaltenen Kopienzahlen wurden ins Verhältnis zu der Kopienzahl der 18S rRNA gesetzt und mit 1000 multipliziert. Von  $n = 6 - 10$  unabhängigen Quotienten wurde der Mittelwert  $\pm$  SEM gebildet und statistische Unterschiede unter Verwendung des *t-Tests* ermittelt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

#### 4.3.4.2 Quantifizierung des TRPM7-Proteins

Die Ergebnisse der Analyse der Protein-Mengen von TRPM7 sind in Abb. 27 dargestellt. Aus der Datenbank „ExPASy Proteomics Server“ wurde für das TRPM7-Protein ein theoretisches Molekulargewicht von 212 kDa ermittelt. Aus der Literatur (He et al., 2004) konnte entnommen werden, dass auch positive Banden bei einem Molekulargewicht von ca. 160 kDa möglich sein könnten.

Im Gehirn (Abb. 27 A) und in der Niere (Abb. 27 B) beider Tierstämme wurden positive immunreaktive Banden bei Molekulargewichten von etwa 160 kDa und ca. 200 kDa nachgewiesen. Der Western Blot mit dem Präimmunserum statt des Antikörpers stellte die Spezifität der immunreaktiven Banden sicher. Von besonderem Interesse war die Expression des TRPM7-Proteins im Muskelgewebe.

Im Musculus tibialis anterior (Abb. 27 C) und im Zwerchfell (Abb. 27 D) von Kontroll- und mdx-Mäusen wurden immunreaktive Bande bei Molekulargewichten von ca. 160 kDa und etwa 200 kDa nachgewiesen. Die weiteren quantitativen Analysen zeigten eine altersabhängige Dezimierung der TRPM7-Proteinmenge in den Kontrolltieren. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde im Muskelgewebe von mdx-Mäusen eine reduzierte Proteinmenge gefunden.



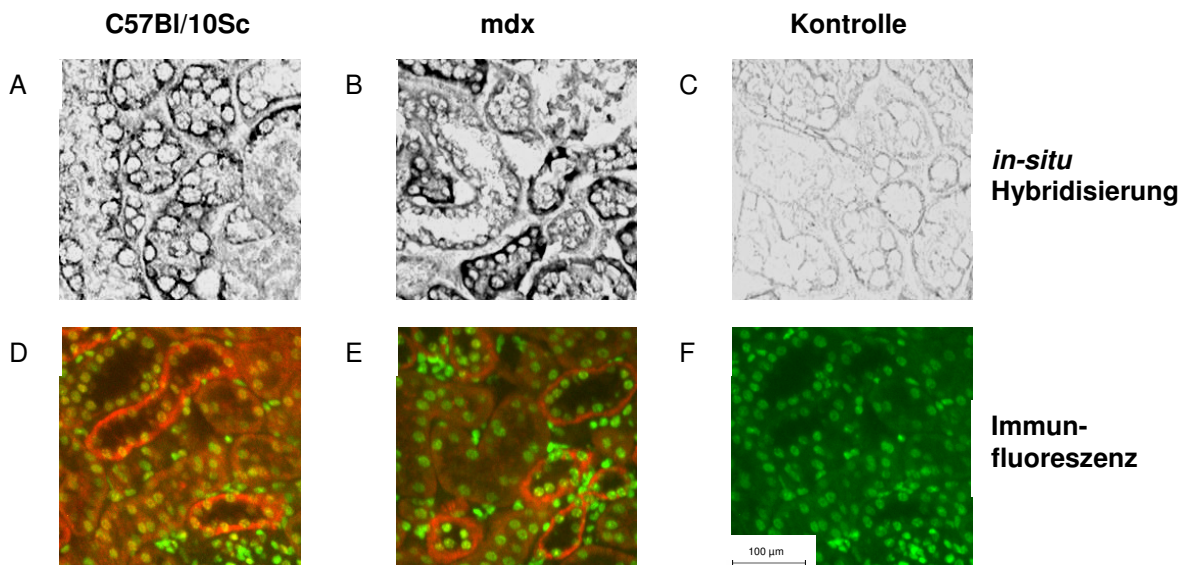
**Abb. 27: Western Blot und Quantifizierung des TRPM7-Proteins**

Die Analyse erfolgte mit Proteinextrakten von Gehirn (A), Niere (B), Musculus tibialis anterior (C) und Zwerchfell (D) von 30 d, 100 d und 365 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels Protein-Elektrophorese und Western Blot. Die Verwendung des Präimmunserums statt des 1. AK gab die Spezifität der immunreaktiven Banden wieder. Die Quantifizierung aller immunreaktiven Banden erfolgte durch Intensitätsbestimmung (DID) mittels „GelScan-Programm“.

#### 4.3.4.3 Lokalisation von TRPM7 in Gewebeschnitten

Als Positivkontrolle für die Lokalisation von TRPM7 diente ebenfalls Nierengewebe (Abb. 28). Die mRNA von TRPM7 wurde in Kontroll- (Abb. 28 A) und mdx-Mäusen (Abb. 28 B) in der Zona glomerulosa des Cortex renalis durchgängig apikal und geringfügig luminal der Epithelzellen der distalen Tubuli lokalisiert. In den proximalen Tubuli wurden apikale und zytoplasmatische Anfärbungen der Epithelzellen nachgewiesen. Die Negativkontrolle stellte die Hybridisierung mit der Sense-cRNA-Sonde dar, wobei hier keine spezifische Anfärbung erfolgte (Abb. 28 C).

Das Protein von TRPM7 wurde in beiden Tierstämmen (Abb. 28 D, E) in der Zona glomerulosa des Cortex renalis in den distalen Tubuli ebenfalls durchgehend apikal und geringer luminal der Epithelzellen gefunden, wobei Co-Lokalisationen von spezifischem Protein (rot) mit Zellkernen (grün) gelb erschienen. In den proximalen Tubulie schien das TRPM7-Protein insgesamt apikal und im gesamten Zytoplasma lokalisiert zu sein. Die Kontrolle zeigte keine spezifische Fluoreszenz für TRPM7 (Abb. 28 F).



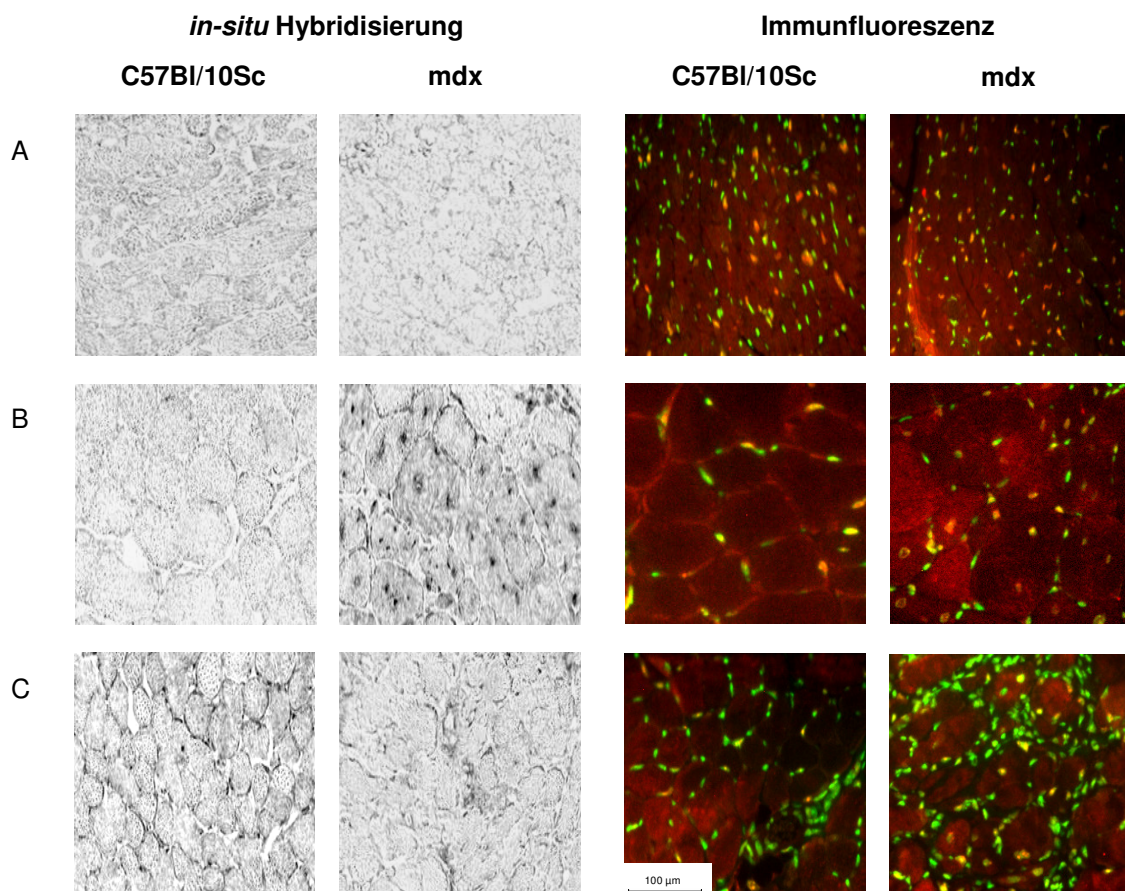
**Abb. 28: Lokalisation der mRNA und des TRPM7-Proteins in Gewebeschnitten der Niere**

A – C: Die Lokalisation der mRNA erfolgte in der Niere von 100 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels *in-situ* Hybridisierung, wobei eine Sondenhybridisierung mit der Antisense-cRNA-Sonde in einer Sekundärreaktion dunkle Anfärbungen hervorrief (A, B). Die Negativkontrolle erfolgte mit der Sense-cRNA-Sonde (C).

D – F: Das TRPM7-Protein wurde in 100 d alten C57Bl/10Sc- (D) und mdx-Mäusen (E) durch eine rote Fluoreszenz des spezifisch gebundenen zweiten Antikörpers *Anti-Rabbit IgG Alexa 568* nachgewiesen. Zusätzlich erfolgte eine Anfärbung der Zellkerne mit „*Sytox@Green*“, wobei eine Co-Lokalisation von Protein und Zellkern gelb erschien. Die Negativkontrolle erfolgte mit dem Peptid-blockierten Antikörper (F).

Bei der Lokalisation von TRPM7 in den Gewebeschnitten des Herzmuskels von Kontroll- und mdx-Mäusen wurden nur schwache positive Nachweise beobachtet, wobei es sich wahrscheinlich um Anfärbungen in Kardiomyozyten handelte (Abb. 29 A).

In den Gewebequerschnitten von Musculus tibialis anterior (Abb. 29 B) und Zwerchfell (Abb. 29 C) von Kontrolltieren wurde TRPM7 vor allem sarkolemmal und perinukleär, aber geringfügig auch zytosolisch in Muskelfasern nachgewiesen. Im Vergleich zu den Kontrolltieren konnte TRPM7 in den Gewebeschnitten der mdx-Mäuse weniger sarkolemmal, aber dafür mehr zytosolisch, besonders in Kernnähe, gefunden werden. Bei der Immunfluoreszenz wurde eine Co-Lokalisation von TRPM7 mit den Zellkernen durch eine gelbe Farbe sichtbar.



**Abb. 29: Lokalisation der mRNA und des TRPM7-Proteins in Muskelquerschnitten von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Die Lokalisation der mRNA und des Proteins erfolgte in Querschnitten von Herz (A), Musculus tibialis anterior (B) und Zwerchfell (C) von 100 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels *in-situ* Hybridisierung und Immunfluoreszenz. Spezifische Nachweise für TRPM7 zeigten sich bei der *in-situ* Hybridisierung durch dunkle Anfärbungen und in der Immunfluoreszenz durch eine rote Fluoreszenz. Co-Lokalisationen zwischen Protein (rot) und Zellkern (grün) erschienen von gelber Farbe.

In der allgemeinen Expression von TRPM7 konnte eine altersabhängige Reduzierung der mRNA und des Proteins in den Muskelgeweben von Kontrolltieren nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde für die mRNA Expression in den mdx-Mäusen kein Unterschied gefunden, während die Protein-Menge aber reduziert war. Die Lokalisationsanalyse zeigte, dass in den Muskelquerschnitten von Kontrolltieren TRPM7 eher sarkolemmal und in den mdx-Mäusen aufgrund der zentralen Zellkerne vielmehr zytosolisch gefunden wurde.

Die bisher näher analysierten TRP-Kationenkanäle waren im Muskelgewebe vorherrschend exprimiert. Sie könnten aufgrund ihrer Ionenselektivität mögliche Kandidaten für einen erhöhten Kalziumeinstrom in Dystrophin-defizienten Muskelfasern darstellen.

#### **4.4 Quantifizierungen der mRNAs von SCN4A, TRPA1, TRPM1 und TRPC5**

Für die Pathologie der Dystrophindefizienz sind aber möglicherweise auch solche Ionenkanäle von Bedeutung, welche in mdx-Mäusen signifikant veränderte Expressionen zeigten. Von den in Abschnitt 4.2 untersuchten Ionenkanälen wurden daher weiterhin SCN4A, TRPA1, TRPM1 und TRPC5 im Folgenden näher betrachtet. Dazu wurden die mRNA-Quantitäten dieser Ionenkanäle bei 30 d, 100 d und 365 d alten Kontroll- und mdx-Mäusen im Musculus tibialis anterior, Musculus gastrocnemius, Zwerchfell und Herz mittels „*Real-time*“ RT-PCR bestimmt.

##### **4.4.1 Quantifizierung der mRNA von SCN4A**

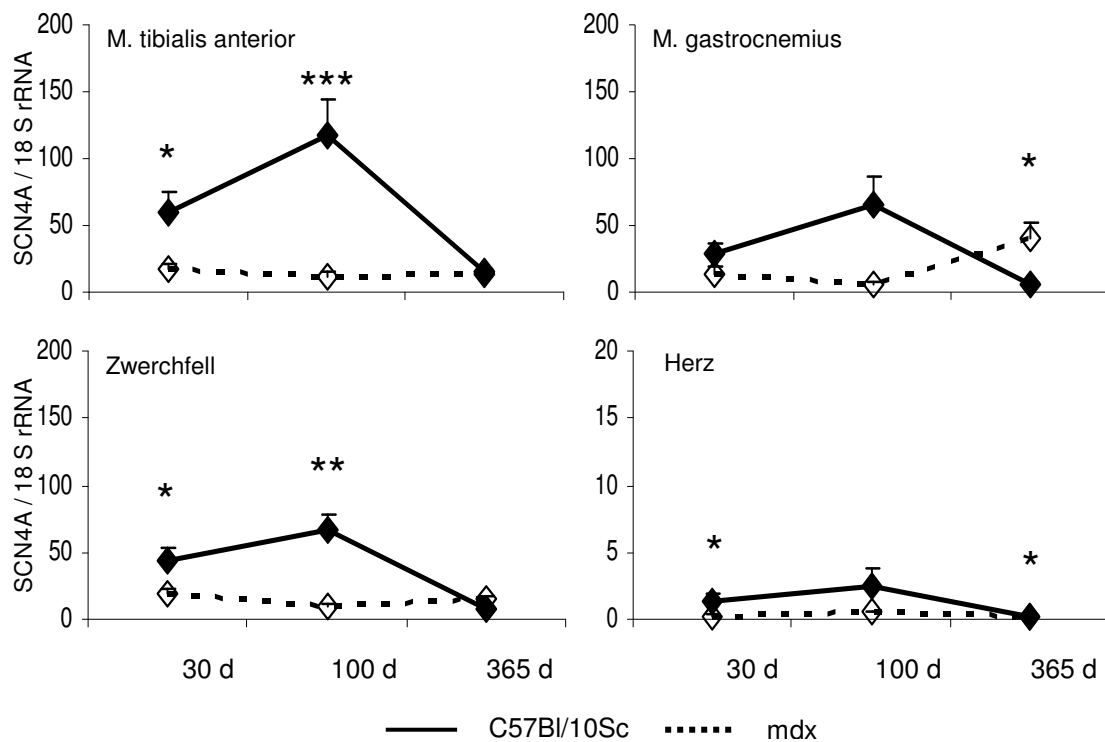
Die Ergebnisse der Analyse der SCN4A-mRNA sind in Abb. 30 dargestellt. Erwartungsgemäß lag die mRNA-Quantität des spannungsgesteuerten Natriumkanals im Muskelgewebe deutlich höher als die Mengen der bisher untersuchten Ionenkanäle.

Im Musculus tibialis anterior von Kontrolltieren erfolgte vom Zeitpunkt von 30 d bis zu 100 d eine Verdopplung der SCN4A-mRNA. Bei einer Altersstufe von 365 d verringerte sich die Expression der SCN4A-mRNA beträchtlich auf etwa 1/4 des Ausgangswertes. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich bei 30 d alten mdx-Mäusen eine halbierte Menge an SCN4A-mRNA. Dieses Phänomen wurde auch bei 100 d alten mdx-Mäusen beobachtet, wobei bei den Mutanten nur etwa 1/4 der Expression von SCN4A von den Kontrolltieren nachgewiesen wurde. Bei 365 d alten Mäusen traten keine Unterschiede zwischen Kontrollen und Mutanten auf.

Im Musculus gastrocnemius von Kontrolltieren wurde nur etwa halb so viel der SCN4A-mRNA exprimiert wie im Tibialismuskel. Der Level erhöhte sich bei 100 d alten Kontrolltieren etwas und verringerte sich dann deutlich zum Zeitpunkt von 365 d. Im Vergleich zu Kontrolltieren wurde bei 365 d alten mdx-Mäusen eine etwas höhere mRNA-Menge gefunden.

Im Zwerchfell spiegelte sich ein ähnliches Expressionsschema wieder wie im Tibialismuskel. Bei 30 d alten Kontrollmäusen lag die Menge an SCN4A-mRNA auf etwa gleichem Niveau wie im Musculus gastrocnemius. Bei 100 d alten Tieren stieg der Level etwas an und reduzierte sich bei 365 d alten Kontrollmäusen auf etwa 1/5 des Ausgangswertes. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren lag die Expression in den mdx-Mäusen auf nahezu konstantem, aber geringerem Niveau. Dadurch wurde bei 30 d, aber auch bei 100 d alten mdx-Mäusen eine signifikante Reduktion auf 1/2 bzw. 1/6 des Wertes der Kontrolltiere nachgewiesen.

Im Herzmuskel lag der Level der mRNA bei 30 d alten Kontrolltieren auf ca. 1/44zigstel von der Menge im Tibialismuskel. Bis zum Zeitpunkt von 100 d verdoppelte sich die Expression und verringerte sich bei 365 d alten Tieren auf 1/10 dieses Wertes. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde bei den mdx-Mäusen eine signifikante Reduktion der mRNA zum Zeitpunkt von 30 d um ca. 1/5 und bei 365 d alten Mutanten um 1/3 gefunden.



**Abb. 30: Quantifizierung der mRNA-Menge von SCN4A in Muskelgeweben von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Der quantitative Nachweis von SCN4A-mRNA erfolgte im Musculus tibialis anterior, Musculus gastrocnemius, Zwerchfell und Herz von 30 d, 100 d und 365 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels „Real-time“ RT-PCR. Die erhaltenen Kopienzahlen wurden ins Verhältnis zu der Kopienzahl der 18S rRNA gesetzt und mit 1000 multipliziert. Von  $n = 10 - 15$  unabhängigen Quotienten wurde der Mittelwert  $\pm$  SEM gebildet und statistische Unterschiede unter Verwendung des *t*-Tests ermittelt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Diese Analyse zeigte, dass die SCN4A-mRNA bei sehr alten Kontrolltieren gegenüber jungen deutlich reduziert war. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde eine signifikante Verringerung der SCN4A-mRNA bei 30 d und 100 d alten mdx-Mäusen nachgewiesen, während die Levels bei 365 d alten Mutanten und Kontrollen gleich niedrig waren.

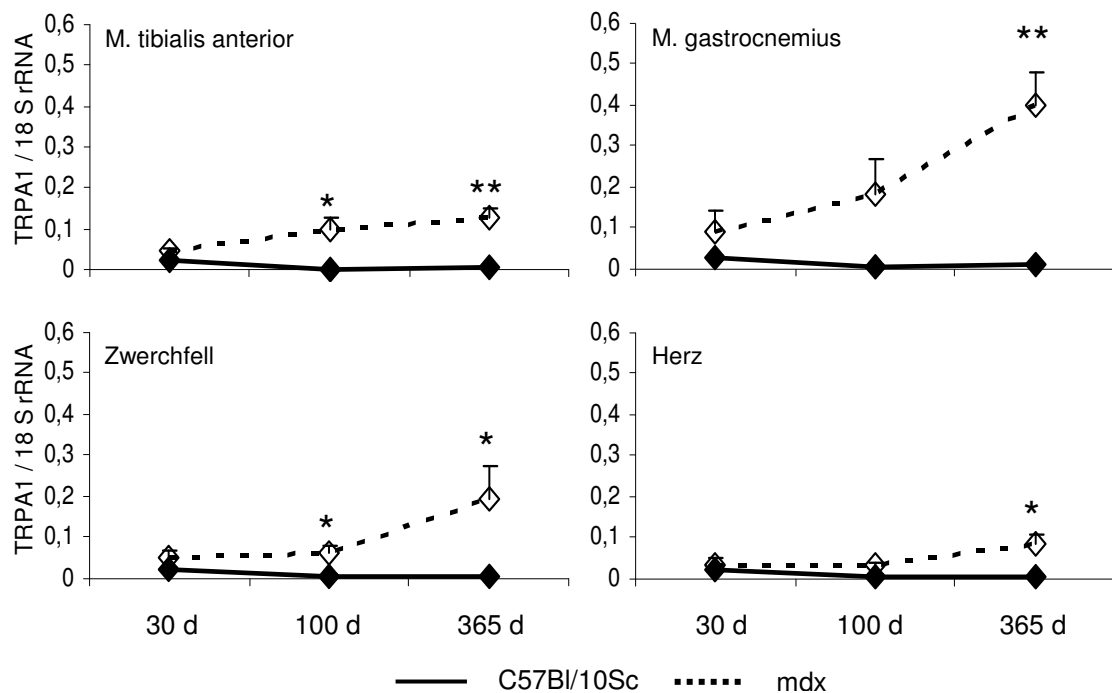
#### 4.4.2 Quantifizierung der mRNA von TRPA1

Neben dem stark exprimierten Gen SCN4A traten aber auch weniger dominant exprimierte Kationenkanäle durch eine veränderte mRNA Expression im Muskelgewebe von 100 d alten mdx-Mäusen in Erscheinung (siehe Abschnitt 4.2). So wie TRPA1, dessen quantitative Analyse der mRNA in Kontroll- und mdx-Mäusen in der Abb. 31 dargestellt ist. Wie dieser Abbildung entnommen werden kann, wurde die mRNA dieses Ionenkanals im Muskelgewebe auf nur sehr geringem Niveau gefunden. Bei 30 d alten Kontrolltieren entsprach die mRNA-Menge im Musculus tibialis anterior in etwa 1/4 der Menge von TRPC3. Die TRPA1-mRNA verringerte sich noch mit zunehmendem Alter der Mäuse. Im Vergleich zu Kontrolltieren war die mRNA-Menge bei 30 d alten mdx-Mäusen etwa gleich, stieg dann aber bei 100 d alten Mutanten auf das Zehnfache an und erhöhte sich bei 365 d alten mdx-Mäusen auf mehr als das 25-fache des Wertes der Kontrolltiere. Im Musculus gastrocnemius von Kontrolltieren entsprach der mRNA-Level von TRPA1 bei allen Altersstufen etwa dem Level vom Tibialis-muskel. Dem gegenüber stand die, bei etwa gleichem Ausgangswert beginnende, kontinuierlich steigende Expression von TRPA1-mRNA in mdx-Mäusen, so dass bei einer Altersstufe von 365 d eine signifikante Erhöhung der mRNA-Menge registriert wurde.

Ein gleiches Schema fand sich auch bei der Betrachtung der mRNA-Quantitäten im Zwerchfell wieder, wo ebenfalls ein geringer Level an TRPA1-mRNA in Kontrolltieren auf konstantem Niveau nachgewiesen wurde. Im Vergleich zu den Kontrolltieren nahmen die mRNA-Quantitäten in mdx-Mäusen altersabhängig stetig zu, so dass sich die TRPA1-mRNA bei 100 d alten mdx-Tieren mehr als Verzehnfachte und zum Zeitpunkt von 365 d fast das 40-fache betrug.

Auch im Herzmuskel trat diese Erscheinung auf. Hier lagen die mRNA-Quantitäten in den Kontrolltieren auf noch geringerem Ausgangsniveau und reduzierten sich ebenfalls mit zunehmendem Alter der Tiere. Bei den 30 d alten mdx-Mäusen wurde die TRPA1-mRNA auf etwa dem selbigen Level exprimiert und stieg dann altersabhängig leicht an, so dass zum Zeitpunkt von 365 d wurde eine vermehrte Expression auf ein 15-faches des Wertes der Kontrolltiere nachgewiesen wurde.





**Abb. 31: Quantifizierung der mRNA-Menge von TRPA1 in Muskelgeweben von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Der quantitative Nachweis von TRPA1-mRNA erfolgte im Musculus tibialis anterior, Musculus gastrocnemius, Zwerchfell und Herz von 30 d, 100 d und 365 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels „Real-time“ RT-PCR. Die erhaltenen Kopienzahlen wurden ins Verhältnis zu der Kopienzahl der 18S rRNA gesetzt und mit 1000 multipliziert. Von  $n \geq 3$  unabhängigen Quotienten wurde der Mittelwert  $\pm$  SEM gebildet und statistische Unterschiede unter Verwendung des *t*-Tests ermittelt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

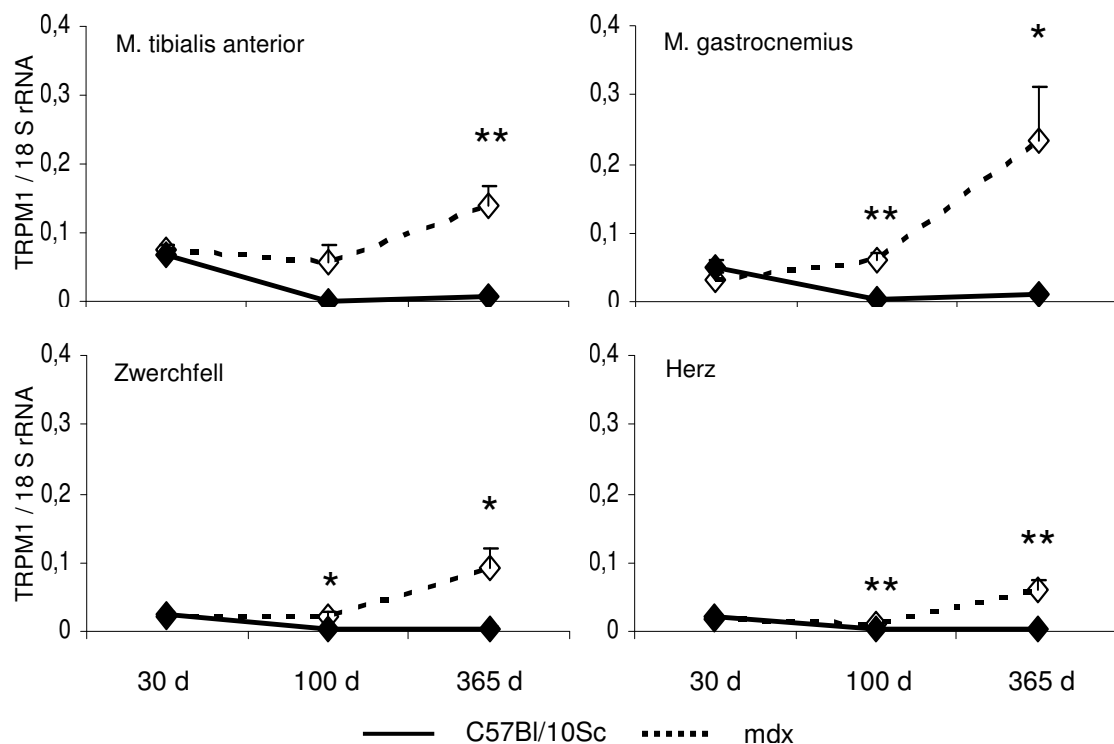
Die quantitative Analyse der mRNA von TRPA1 im Muskelgewebe zeigte eine geringe Expression in den Kontrolltieren, welche sich mit zunehmendem Alter der Tiere noch reduzierte. Im Vergleich dazu wurde in den mdx-Mäusen eine altersabhängige signifikante Zunahme von TRPA1-mRNA gefunden.

#### 4.4.3 Quantifizierung der mRNA von TRPM1

Wie schon TRPA1 zeigte auch TRPM1 in der Untersuchung im Abschnitt 4.2 im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöhte mRNA-Mengen im Muskelgewebe von 100 d alten mdx-Mäusen und wurde daher, trotz der allgemein geringen mRNA Expression, näher betrachtet. Die Ergebnisse der weiteren Analyse sind in der Abb. 32 dargestellt. Im Musculus tibialis anterior von Kontrolltieren entsprach der Level der mRNA von TRPM1 etwa dem Level von TRPA1. Die TRPM1-mRNA reduzierte sich bis zu einer Altersstufe von 365 d auf 1/10 des Ausgangswertes.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigten 365 d alte mdx-Mäuse eine 15-fach erhöhte mRNA-Menge im Tibialismuskel.

Im Musculus gastrocnemius, im Zwerchfell und auch im Herzen spiegelte sich ein ähnliches Expressionsschema wieder. In allen drei Muskeln von Kontrolltieren fand eine Reduktion der mRNA mit zunehmendem Alter der Mäuse statt. Gegensätzlich verhielt sich die, bei ähnlichem Ausgangswert beginnende, Expression der TRPM1-mRNA in den mdx-Mäusen. Bei einer Altersstufe von 100 d wurde in drei Muskelgeweben ein signifikant erhöhter Level an TRPM1-mRNA in den Mutanten gefunden. Zum Zeitpunkt von 365 d steigerte sich das Niveau um etwa das vierfache der Expression von 100 d alten mdx-Mäusen und lag bei allen Muskeln signifikant höher als in Kontrolltieren.



**Abb. 32: Quantifizierung der mRNA-Menge von TRPM1 in Muskelgeweben von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Der quantitative Nachweis von TRPM1-mRNA erfolgte im Musculus tibialis anterior, Musculus gastrocnemius, Zwerchfell und Herz von 30 d, 100 d und 365 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels „Real-time“ RT-PCR. Die erhaltenen Kopienzahlen wurden ins Verhältnis zu der Kopienzahl der 18S rRNA gesetzt und mit 1000 multipliziert. Von  $n \geq 3$  unabhängigen Quotienten wurde der Mittelwert  $\pm$  SEM gebildet und statistische Unterschiede unter Verwendung des *t*-Tests ermittelt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

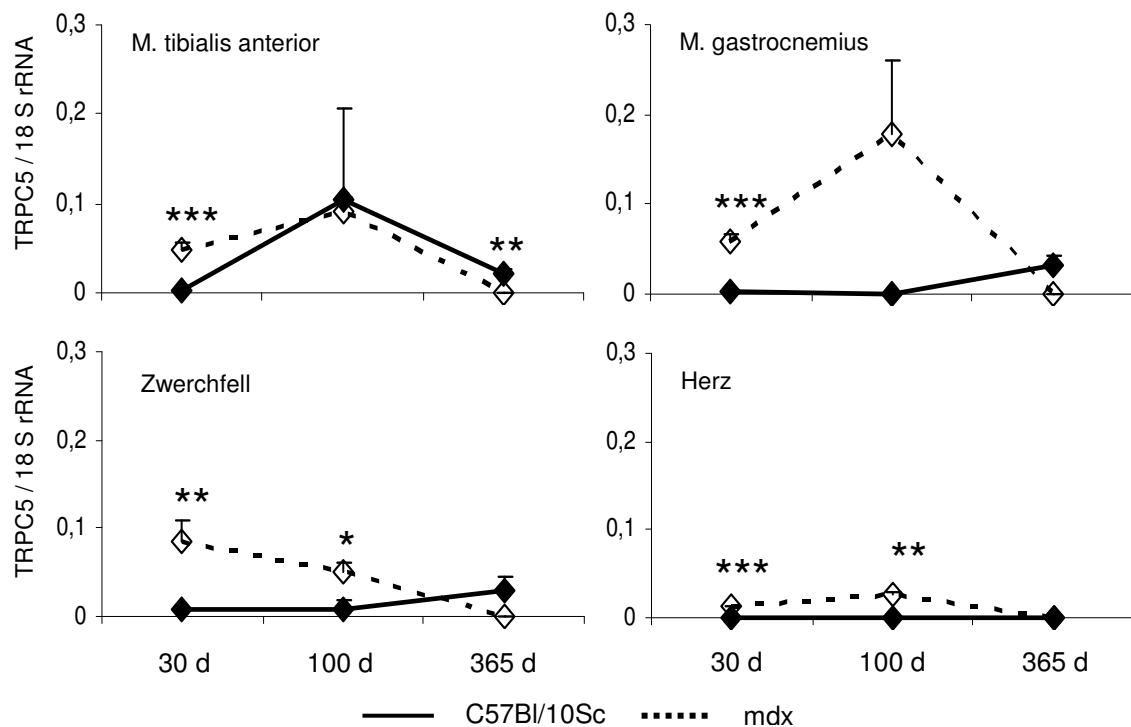
Für TRPM1 wurde ein sehr geringer Level an mRNA im Muskelgewebe von Kontrolltieren nachgewiesen, welcher sich altersabhängig reduzierte. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde bei den mdx-Mäusen eine signifikante Erhöhung der TRPM1-mRNA mit zunehmendem Alter der Mutanten festgestellt.

#### **4.4.4 Quantifizierung der mRNA von TRPC5**

Der letzte Vertreter mit einer geringen, dennoch veränderten mRNA Expression bei 100 d alten mdx-Mäusen aus dem Abschnitt 4.2 war TRPC5, dessen weitere Analyse in der Abb. 33 dargestellt ist. Im Musculus tibialis anterior von 30 d alten Kontrolltieren betrug die mRNA-Quantität von TRPC5 nur etwa die Hälfte von TRPM1. Bei 100 d alten Kontrolltieren lag das Niveau der mRNA deutlich höher und fiel zum Zeitpunkt von 365 d auf das Siebenfache des Ausgangswertes ab. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde in 30 d alten mdx-Mäusen die TRPC5-mRNA um mehr als das 15-fache verstärkt exprimiert gefunden. Bei einer Altersstufe von 100 d war der Level etwa gleich und bei 365 d alten mdx-Mäusen wurde eine signifikante Reduktion der mRNA von TRPC5 nachgewiesen.

Im Musculus gastrocnemius von Kontrolltieren war der Level an TRPC5-mRNA sehr gering und stieg bis zu einer Altersstufe von 365 d auf etwa das 10-fache des Ausgangswertes an. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde bei 30 d alten mdx-Mäusen ein signifikant erhöhter Level an TRPC5-mRNA auf das 20-fache des Wertes der Kontrolltiere gefunden, welcher sich dann aber altersabhängig deutlich reduzierte.

Während die mRNA in Zwerchfell und Herz von Kontrolltieren auf eher geringem Niveau lag und nur bei 365 d alten Tieren leicht anstieg, wurde bei 30 d alten mdx-Mäusen eine mehr als 10-mal höhere Menge an TRPC5-mRNA gefunden. Trotz Reduzierung der TRPC5-mRNA bei 100 d alten mdx-Mäusen war der Level immer noch signifikant höher als in Kontrollen, während bei 365 d alten Tieren keine Unterschiede mehr registriert wurden.



**Abb. 33: Quantifizierung der mRNA-Menge von TRPC5 in Muskelgeweben von C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen**

Der quantitative Nachweis von TRPC5-mRNA erfolgte im Musculus tibialis anterior, Musculus gastrocnemius, Zwerchfell und Herz von 30 d, 100 d und 365 d alten C57Bl/10Sc- und mdx-Mäusen mittels „Real-time“ RT-PCR. Die erhaltenen Kopienzahlen wurden ins Verhältnis zu der Kopienzahl der 18S rRNA gesetzt und mit 1000 multipliziert. Von  $n \geq 3$  unabhängigen Quotienten wurde der Mittelwert  $\pm$  SEM gebildet und statistische Unterschiede unter Verwendung des *t-Tests* ermittelt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Die Expression von TRPC5 erfolgte in Kontrollmäusen auf sehr geringem Niveau. Der Vergleich der Expression von TRPC5-mRNA in mdx-Mäusen zu Kontrollen zeigte bei sehr jungen Mutanten in allen vier untersuchten Muskeln eine signifikante Erhöhung von TRPC5.