

Aus dem Institut für Pathophysiologie
(Direktor: Professor Dr. rer. nat. Heinrich Brinkmeier)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Die Deletion des Kationenkanals TRPV4 im Mausmodell
verursacht keine ausgeprägten Veränderungen der
Skelettmuskelstruktur: Ein Vergleich mit dem dystrophen
mdx-Modell

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2022

vorgelegt von:

Robert Dreist

geb. am: 02.11.1989

in: Berlin

Diese Arbeit sei meinen Eltern gewidmet.

Dekan:	Prof. Dr. med. Karlhans Endlich (Komm. Wissenschaftlicher Vorstand)
1. Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Heinrich Brinkmeier
2. Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Stephan Kröger (Planegg-Martinsried)
Ort, Raum:	Hansestadt Greifswald, Martin-Luther-Str. 6, Seminarraum 106
Tag der Disputation:	06.09.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Die Muskeldystrophie Duchenne	5
1.1.1	Geschichte	5
1.1.2	Ursachen und Pathophysiologie	6
1.1.3	Symptomatik und Verlauf	7
1.1.4	Diagnostik	7
1.1.5	Therapie	8
1.2	Bisherige Erkenntnisse	8
1.2.1	Der Muskelaufbau und die Affektion in der Muskeldystrophie Duchenne	8
1.2.2	Die Familie der TRP-Kanäle	11
1.2.3	Der Kationen-Kanal TRPV4	12
2	Fragestellung	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Versuchstiere	19
3.2	Probenentnahme und Konservierung	19
3.3	Anfertigung von Kryoschnitten	20
3.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	20
3.5	Auswertung der HE-gefärbten Schnitte	21
3.6	Sirius-Rot-Färbung	22
3.7	Auswertung der Sirius-Rot-gefärbten Schnitte	22
3.8	Immunhistochemische Färbung	23
3.9	Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte	24
3.10	Digitalisierung und Erstellung der Diagramme und Abbildungen	24
3.11	Statistische Auswertung	25
3.12	Fehlerbetrachtung	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Faserkaliber	26
4.1.1	M. soleus	27
4.1.2	M. tibialis anterior	28
4.1.3	M. extensor digitorum longus	29
4.1.4	Diaphragma	29

4.2	Kollagengehalt	31
4.2.1	M. soleus	31
4.2.2	M. tibialis anterior	32
4.2.3	M. extensor digitorum longus	33
4.2.4	Diaphragma	34
4.3	Fasertypisierung	35
4.3.1	M. soleus	36
4.3.2	M. tibialis anterior	36
4.3.3	M. extensor digitorum longus	37
4.3.4	Diaphragma	38
5	Diskussion	40
6	Zusammenfassung	45
7	Literaturverzeichnis	47
8	Abkürzungsverzeichnis	62
9	Anhang	63
9.1	Ergebnisse Faserkaliber	63
9.2	Ergebnisse Kollagengehalt	65
9.3	Ergebnisse Fasertypisierung	66
10	Danksagungen	68

1 Einleitung

1.1 Die Muskeldystrophie Duchenne

Der Begriff Muskeldystrophie beschreibt eine Gruppe von Erbkrankheiten, die durch progressive Degeneration von Muskelfasern gekennzeichnet sind. Die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne ist dabei eine der häufigsten und schwersten Formen.

1.1.1 Geschichte

Die frühesten Hinweise auf Muskeldystrophien gibt es in ägyptischen Grabmalereien, die auf ca. 2800-2500 v. Chr. datiert werden [1]. Außerdem zeigt ein ägyptisches Relief, das um 1500 v. Chr. entstand, einen möglichen Fall [2]. Im Jahr 1520 n. Chr. schuf der italienische Maler Raffael das Werk „Verklärung Christi“, in dem Duchenne bei der Betrachtung des dargestellten Jungen einen möglichen Fall pseudohypertropher Muskeldystrophie erkannte [1]. 1830 beschrieb der chirurgische Anatom Charles Bell den Fall eines Jungen, dessen klinische Symptome und Krankengeschichte mit einer Muskeldystrophie vereinbar sind [3]. Die erste vollständige Beschreibung der Krankheit wird dem Londoner Arzt Edward Meryon zugeschrieben. Meryon beobachtete acht Jungen aus drei Familien [4] und beschrieb mikroskopische Veränderungen der Muskeln und des Rückenmarks [5]. Namensgeber ist jedoch der französische Elektrophysiologe Guillaume Benjamin Amand Duchenne (Duchenne du Bologne), der durch neue Techniken in der Lage war, Muskelbiopsien zu entnehmen und die Diagnose schon zu Lebzeiten zu stellen. Außerdem konnte er so die Degeneration der Muskelfasern im Laufe des Lebens des Patienten beobachten. 1868 wurden seine Studien in mehreren Artikeln veröffentlicht [6]. Der Londoner Arzt William R. Gowers versuchte 1879 einen kompletten Überblick zu geben und berücksichtigte insbesondere die klinische Symptomatik, die Prognose und Therapieansätze [7]. Eines der prominentesten Symptome der Muskeldystrophie hat als „Gowers-Manöver“ Einzug in die Literatur gehalten.

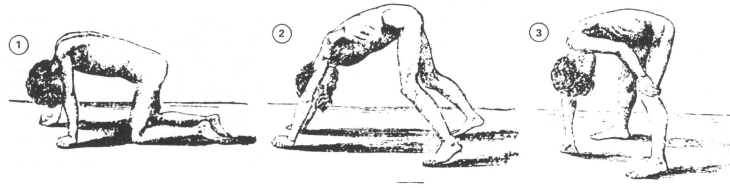


Abbildung 1: Gowers-Manöver. Der abgebildete Junge stützt sich beim Aufrichten zunächst am Boden, dann an Unter- und Oberschenkeln ab [7].

Außerdem fiel Gowers' Augenmerk auf das Vererbungsmuster, das er als das gleiche wie bei der Hämophilie erkannte. 1900 wurden die Mendelschen Regeln als Grundlage und kurz darauf das X-Chromosom als Genlocus benannt [1]. Bis zu diesem Zeitpunkt ging man davon aus, dass es sich bei der Muskeldystrophie um eine einzige Krankheit handele. Der Heidelberger Neurologe Wilhelm Heinrich Erb bemerkte jedoch solche Unterschiede zwischen den Fällen, dass er erklärte, es müsse sich um eine Gruppe von Krankheiten handeln [8]. In diesem Zusammenhang beschrieben Becker und Kiener 1955 einen milderen Verlaufstyp [9], heute sind über 50 Muskeldystrophien mit verschiedenen genetischen Defekten bekannt [10, 11]. 1987 gelang es, das Dystrophinogen als das für die Duchenne Muskeldystrophie verantwortliche zu identifizieren, das Genprodukt wurde Dystrophin genannt [12].

1.1.2 Ursachen und Pathophysiologie

Die Duchenne-Muskeldystrophie tritt mit einer Häufigkeit von 1:3300 bei männlichen Neugeborenen auf. Ursächlich für die Erkrankung sind Mutationen im Dystrophin-Gen auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms. Diese sind zu einem Drittel Neumutationen, bei zwei Dritteln der Patienten wird die Mutation durch die Mutter vererbt. Das Dystrophin spielt beim Gesunden eine wesentliche Rolle in der Verbindung von Membranproteinen mit dem kontraktilen Apparat der Muskelzelle (Dystrophin-Glykoprotein-Komplex).

Sein Fehlen führt zum Abbau anderer Proteine des Komplexes, zu Schäden der Zellmembran, Verlust intrazellulärer Substanzen, einer gestörten Calcium-Homöostase und letztlich zum progredienten Verlust von Muskelzellen, die durch Fett- und Bindegewebe ersetzt werden. [14, 15, 16]

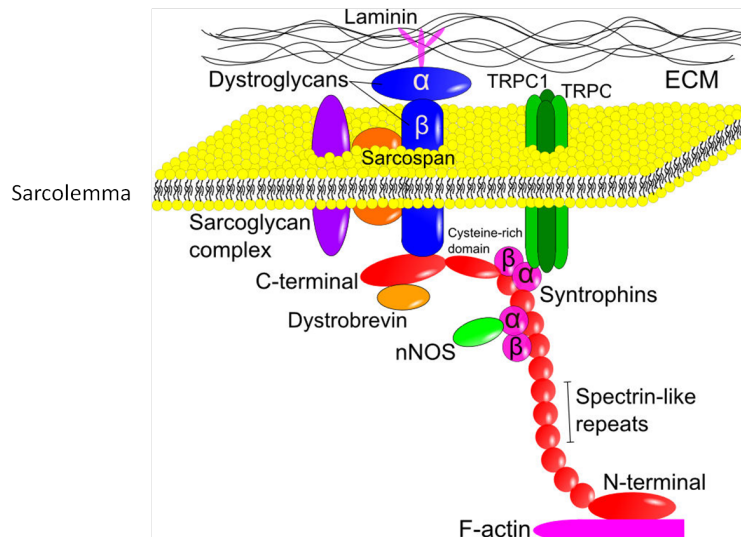


Abbildung 2: Schematisches Modell des Dystrophin-Glycoprotein-Komplexes modifiziert nach [13]

1.1.3 Symptomatik und Verlauf

Die betroffenen Jungen zeigen meist von Geburt an muskuläre Schwächen und erlernen das freie Laufen verzögert und unsicher. Die Symptome sind jedoch oft so schwach ausgeprägt, dass sie erst im dritten bis vierten Lebensjahr auffallen. Im Kindesalter zeigen die Waden durch die vermehrte Ausbildung von Fett- und Bindegewebe eine charakteristische Pseudohypertrophie. Die Lendenwirbelsäule erscheint stärker gekrümmt (Hyperlordose). Im Blut finden sich erhöhte Creatinkinase-Werte. Wegen der zunehmenden motorischen Einschränkungen sind die Kinder in der Regel mit 8-10 Jahren auf einen Rollstuhl angewiesen. Im weiteren Verlauf kommt es zur Generalisierung der Dystrophie, eine Ausnahme bilden dabei die äußeren Augenmuskeln. Der Herzmuskel ist bei 95% der 18-Jährigen betroffen, es kommt zu Kardiomyopathien und zu Erregungsleitungsstörungen. Die zunehmende Schwächung der Atemmuskulatur führt zur Ateminsuffizienz, die Atemwege werden dann häufig von Infektionen befallen. Die Lebenserwartung liegt nach unterschiedlichen Angaben zwischen 25-40 Jahren [16, 17].

1.1.4 Diagnostik

Die Anamnese, insbesondere die Familienanamnese, liefert erste Hinweise auf die Diagnose. Zudem fallen erhöhte Werte der Creatinkinase im Serum (>1000 U/l) auf. Außerdem zeigen sich Veränderungen im EMG (polyphasische und niedrige Amplituden

der Aktionspotentiale mit dichtem Antwortmuster). In der Muskelbiopsie imponieren eine Zunahme von Fett und Bindegewebe und Zeichen der Faserneubildung, Degeneration und Regeneration. Die definitive Diagnose wird durch immunhistologische Verfahren sowie die Sequenzierung des DMD-Gens gestellt [15, 16, 17].

1.1.5 Therapie

Die therapeutischen Möglichkeiten sind begrenzt und symptomatisch. Frühzeitig wird die Muskulatur physiotherapeutisch beübt, um die Regeneration zu fördern. Zur Hemmung der Entzündung ist der Einsatz von Kortikosteroiden indiziert. Diese haben auch einen positiven Effekt auf die Erhaltung kardialer und respiratorischer Muskelkraft. Zusätzlich können bei Kontrakturen und starker Kyphoskoliose operative Eingriffe notwendig werden. Bei fortgeschrittener Schädigung der Atemmuskulatur benötigen die Patienten außerdem eine nichtinvasive Beatmung über Nasen- und Mundmasken [16].

Die aktuelle Forschung fokussiert mehrere Kernprobleme der DMD. So zielt sie auf die Kontrolle der Fibrose, der Entzündungsreaktionen und der Muskelatrophie sowie auf die Stimulation von Muskelwachstum und Regeneration. Zudem gibt es bereits Ansätze, durch Gen- und Zelltherapie funktionelles Dystrophin wiederherzustellen [18, 19].

1.2 Bisherige Erkenntnisse

Wie erwähnt umfasst die aktuelle Forschung vielfältige Untersuchungen zur Behandlung der DMD. Dabei ergaben sich aufschlussreiche Ergebnisse in der histologischen Untersuchung der betroffenen Skelett- und Herzmuskelzellen sowie der glatten Muskulatur. Entsprechende Erkenntnisse hielten Einzug in die Therapie, insbesondere innerhalb der physiotherapeutischen Beübung betroffener Muskeln.

Die Entdeckung der gestörten Calcium-Homöostase in den Muskelzellen der Erkrankten rückte auch entsprechende Kanäle in den Fokus der Untersuchungen. So wurden Transkripte für Mitglieder der TRPC, TRPV, TRPM und TRPA Subfamilien der TRP-Kationen-Kanäle in unterschiedlichen Geweben der Maus gefunden [20].

1.2.1 Der Muskelaufbau und die Affektion in der Muskeldystrophie Duchenne

Der gesunde Skelettmuskel zeigt im histologischen Querschnitt eine homogene Anordnung der einzelnen Muskelzellen (Muskelfasern). Die Zellkerne liegen dabei in charakteristischer Weise randständig. Der Anteil an Bindegewebe ist gering, die Fasern haben

einen annähernd einheitlichen Umfang. Die Fasern werden dabei nach verschiedenen Eigenschaften in Fasertypen eingeteilt. Dabei sind Kontraktionsgeschwindigkeit, die metabolischen Eigenschaften der Faser sowie die exprimierte Isoform der schweren Kette des Myosins von Bedeutung. Diese Isoformen sind im Mausmodell als MHCI, MHCIIa, MHCIIx und MHCIIb benannt [21]. In menschlichen Skelettmuskeln wird die Isoform MHCIIb beim Gesunden nicht exprimiert [22, 23]; interessanterweise findet sich aber MHCIIb-mRNA in fetalen Muskelzellen und in Muskeln von Patienten mit der Muskeldystrophie Duchenne [24]. Die Muskelfasern werden folgend als Typ I, Typ IIA, Typ IIX und Typ IIB bezeichnet, die Typ IIX-Fasern werden in der Fachliteratur teilweise auch als Typ IID (das Myosin dementsprechend als MHCIIId) erwähnt [25]. Daneben sind Hybridfasern bekannt, die zwei Myosin-Isoformen exprimieren (I/IIA, IIA/IIX und IIX/IIB) [26]. Die Fasern lassen sich dann nach Kontraktionsgeschwindigkeit ordnen:

$$I < I/IIA < IIA < IIA/IIX < IIX < IIX/IIB < IIB [27].$$

Muskelgewebe mit einem hohen Gehalt an Typ I-Fasern ist gut durch durchblutet; die Fasern weisen einen hohen Gehalt an Mitochondrien auf. Sie zeigen eine geringe Ermüdbarkeit und eine langsame Kontraktionsgeschwindigkeit. Muskeln mit einem hohen Anteil an Typ I-Fasern werden wegen der dauerhaften Leistungsfähigkeit zur Einhaltung der Körperstellung und für sich langsam wiederholende Bewegungen benötigt. Durch den hohen Myoglobingehalt erscheinen diese Muskeln rötlich gefärbt und werden deshalb auch als „rote Muskulatur“ bezeichnet.

Die Fasern vom Typ IIA kontrahieren und erschlaffen schnell. Durch eine hohe Anzahl an Enzymen für die anaerobe Glycolyse kann schnell Energie zur Kontraktion bereitgestellt werden, durch die gleichzeitig hohe Mitochondriendichte ermüden die Fasern nur langsam. Sie werden daher für schnelle und wiederholte Bewegungen benötigt.

Die Fasern vom Typ IIX haben beim Menschen die schnellste Kontraktionsgeschwindigkeit. Durch ihren relativ großen physiologischen Querschnitt können sie am meisten Kraft aufbringen, ermüden aber wegen des hauptsächlich anaeroben Metabolismus' schnell. Muskeln, die hauptsächlich aus diesen Fasern zusammengesetzt sind, erfüllen Aufgaben zur kurzfristigen und maximalen Kraftentwicklung [28, 29].

Die Muskelfasern vom Typ IIB (die beim Menschen nicht vorkommen) weisen eine noch schnellere Kontraktionsgeschwindigkeit als der Typ IIX auf und sollen im Übrigen ähnliche Eigenschaften haben [23].

	Fasertyp		
	I	IIA	IIX
Kontraktionsgeschwindigkeit	langsam	schnell	schnell
Kontraktionskraft	gering	mittelgradig	stark
Ermüdbarkeit	gering	mittelgradig	hoch
Mitochondriendichte	hoch	mittelgradig	gering
Kapazität für oxidative Phosphorylierung	hoch	hoch	niedrig
Kapazität für anaerobe Glycolyse	niedrig	mittelgradig	hoch
Kapillardichte	hoch	mittelgradig	niedrig
Myoglobingehalt	hoch	niedrig	niedrig

Tabelle 1: Fasertypen und ihre Eigenschaften modifiziert nach [28]. Gekürzt um die Fasern vom Typ IIB, die sich im menschlichen Skelettmuskel nicht finden.

Alle Fasern vom Typ II erscheinen wegen des geringen Myoglobingehalts weniger stark gefärbt als die Fasern vom Typ I. Sie werden deshalb auch als „weiße Muskulatur“ bezeichnet [30]. Der im Muskel vorherrschende Fasertypus ist dabei veränderlich, je nach Belastung oder Training kann sich die Fasertypenzusammensetzung umbilden [31].

In der Muskeldystrophie Duchenne verändert sich das histologische Erscheinungsbild eines betroffenen Muskels. Als Zeichen der Faserdegeneration und -regeneration finden sich Fasern mit stark variierenden Kalibern und zentral liegenden Zellkernen. Das Bindegewebe ist als Zeichen der Fibrose deutlich vermehrt. Zudem imponieren nekrotische Areale [32]. Zur Veranschaulichung dieser Effekte zeigt die Abbildung 3 zwei Muskelquerschnitte aus dem Tiermodell (Maus). Sie vergleicht Wildtyp-Muskulatur (BL/10) mit der der *mdx*-Maus, einer Mutante, die in der Forschung als Tiermodell für die Untersuchung der Duchenne Muskeldystrophie verwendet wird. Dieses Modell wird im Kapitel 3.1 genauer erläutert.

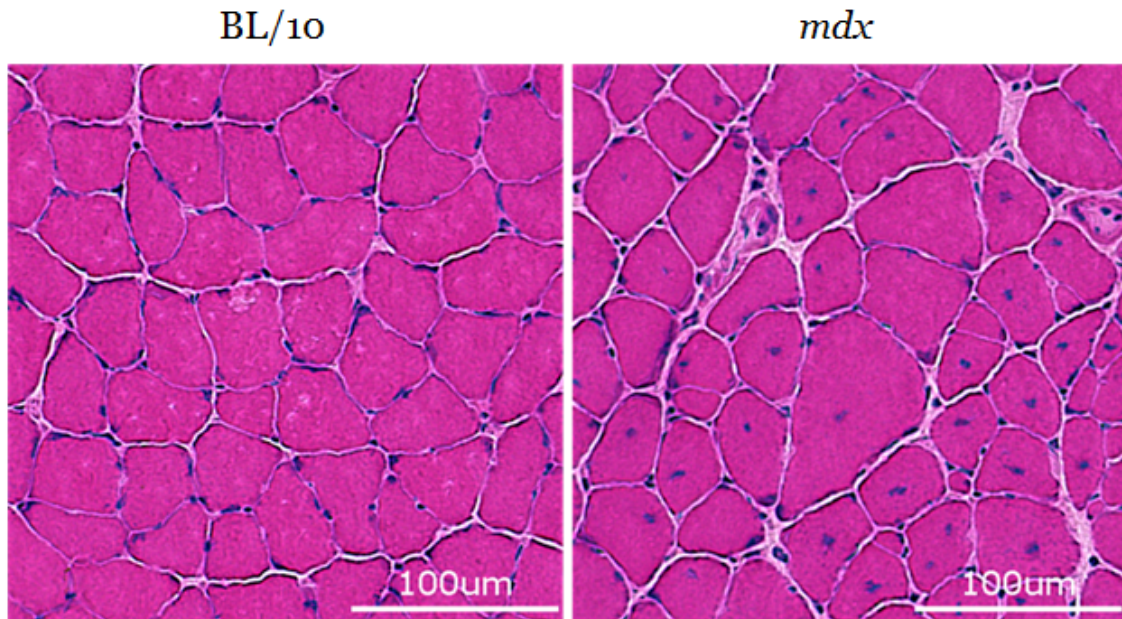


Abbildung 3: Muskelquerschnitte (M. soleus) von der Maus. DMD-Mutante (*mdx*) im Vergleich zum Wildtyp (BL/10), Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die schnellen Fasern vom Typ II sind stärker von der Degeneration betroffen, sodass ein „Fasertypen-Shift“ in Richtung der vermehrten Ausbildung von Typ I-Fasern eintritt [33].

1.2.2 Die Familie der TRP-Kanäle

Erste Hinweise auf die TRP-Proteine erhielten Cosens und Manning in ihrer Forschung zur Phototransduktion an einer Mutante von *Drosophila melanogaster*. Sie stießen auf einen Kanal, der einen Transmembranstrom trotz weiterbestehendem auslösenden Reiz nur transient generierte, während dieser Strom im Wildtyp kontinuierlich nachzuweisen war [34]. 1989 konnte das entsprechende Protein identifiziert werden. Es wurde nach seinen Eigenschaften als Transient-Rezeptor-Potential Kanal bezeichnet [35]. In den folgenden Jahren sind diese Kanäle umfangreich untersucht worden. Heute sind 29 Isoformen in sieben Subfamilien bekannt und nach Liganden oder Eigenschaften benannt [36, 37, 38].

TRPC	TRPN	TRPM	TRPV	TRPA	TRPP	TRPML
Klassisch	NOMPC	Melastatin	Vanilloid	Ankyrin	Polycystin	Mucolipin
TRPC1	TRPN1	TRPM1	TRPV1	TRPA1	TRPP2	TRPML1
TRPC2		TRPM2	TRPV2		TRPP3	TRPML2
TRPC3		TRPM3	TRPV3		TRPP5	TRPML3
TRPC4		TRPM4	TRPV4			
TRPC5		TRPM5	TRPV5			
TRPC6		TRPM6	TRPV6			
TRPC7		TRPM7				
		TRPM8				

Tabelle 2: Die TRP-Kanäle modifiziert nach [39].

Obwohl die meisten Funktionen der Kanäle bislang ungeklärt scheinen, konnte gezeigt werden, dass sie in unterschiedlichsten Zellen und Geweben vielfältige Funktionen übernehmen. Sie fungieren als Kationenkanäle mit unterschiedlicher Permeabilität für Natrium-, Kalium-, Magnesium- und Kalziumionen, teilweise sogar für große organische Kationen [40, 41, 42]. Die Regulierung erfolgt dabei über diverse Mechanismen. Einige Kanäle werden direkt durch Veränderungen der Osmolarität (TRPV4) oder der Temperatur (TRPV1,V2), oder durch mechanische Provokation aktiviert [43]. Andere Kanäle werden über die Bindung von Liganden und eine spezielle Signalkaskade aktiviert (TRPC-Subfamilie) [44]. Auch eine speicher-gesteuerte Arbeitsweise zur Regulierung der Kalzium-Konzentration im sarkoplasmatischen Retikulum wurde diskutiert [45, 46, 47]. Die Proteine bestehen aus sechs Transmembrandomänen, die Porendomäne befindet sich dabei zwischen dem fünften und sechsten Segment. Unmittelbar neben dieser Porendomäne findet sich eine in jeder Subfamilie identische Aminosäuresequenz [48]. Sowohl der Carboxy- als auch der Aminoterminus liegen intrazellulär [35]. Ein funktioneller Kanal besteht aus homo- oder heterotetrameren Komplexen dieser Proteine [49]; auch Komplexe aus mehreren Kanälen sind nachgewiesen worden [50].

1.2.3 Der Kationen-Kanal TRPV4

Im Oktober des Jahres 2000 veröffentlichten die Forschergruppen um Liedtke und Strotmann jeweils Arbeiten, in denen die DNA des TRPV4-Proteins erstmalig nachgewiesen wurde. Der Kanal wurde initial als VR-OAC (vanilloid-receptor related osmotically activated channel) [51] beziehungsweise OTRPC4 (OSM9-like transient re-

ceptor potential channel, member 4) [52] bezeichnet. Bereits 2001 konnten Transkripte der TRPV4-DNA in Speiseröhre, Niere, Leber, Lunge, Milz und der Haut des Menschen gefunden werden [53]. Heute ist eine breite Expression des Proteins bekannt, es konnte in Hepatozyten, Pneumozyten, Adipozyten, Keratinozyten, im Gefäßendothel, in der Niere und der Harnblase, der Plazenta, den Hoden, der Speise- und der Luft- röhre, im Hypothalamus, im Plexus choroideus, in der Substantia nigra, im Ganglion trigeminale, den inneren und äußeren Haarzellen, den Ganglien der spinalen Hinterwur- zeln sowie der sympathischen und parasymphathischen Neuronen nachgewiesen werden. [49, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62]. Außerdem wurde der Kanal in Muskelzellen von Herz-, Gefäß- und Skelettmuskulatur gefunden [63, 64, 65].

Genlocus und Aufbau

Der Genlocus für das menschliche Protein liegt auf Chromosom 12q24.11. Das Gen hat 16 Exons, das vollständige Protein besteht aus 871 Aminosäuren. Dabei sind acht Spleißvarianten beschrieben, von denen sechs für Proteine codieren [66].

Das Protein TRPV4 ist ein Mitglied der TRPV-Subfamilie und ein nichtselektiver, aus- wärtsrichtender Kationen-Kanal. Die Permeabilität ist dabei für Kalzium-Ionen sechs- fach höher als die für Natrium-Ionen [67]. Wie alle TRP-Kanäle besitzt der TRPV4 sechs Transmembrandomänen, zwischen dem fünften und sechsten Segment befindet sich eine Schleife, die die Pore bildet. Vier Untereinheiten bilden den Kanal [68]. Am N-Terminus befinden sich sechs Ankyrinwiederholungsdomänen (ANK) [69].

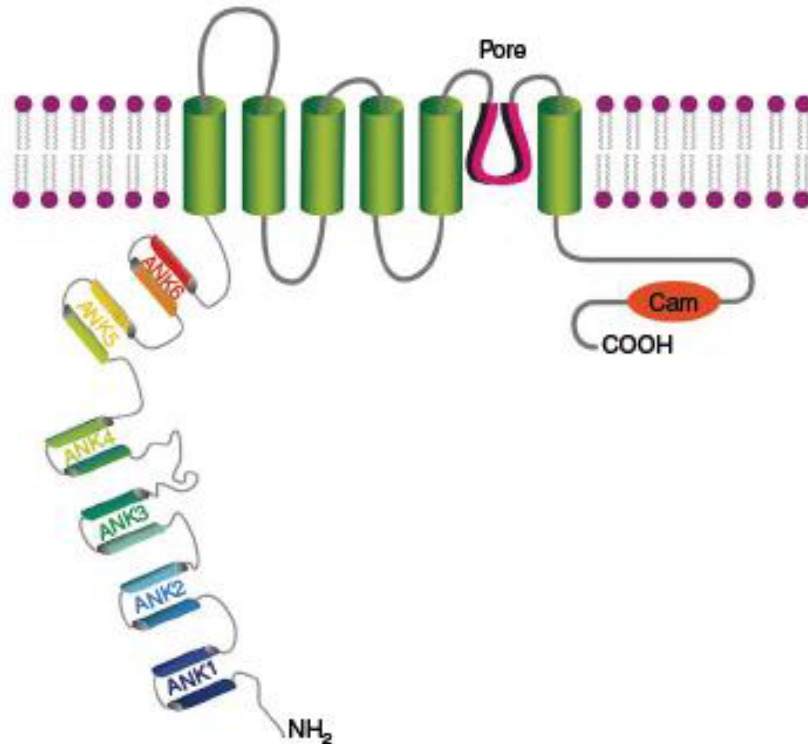


Abbildung 4: Schematische Darstellung von TRPV4 modifiziert nach [70]. Gezeigt sind die sechs Transmembransegmente als grüne Zylinder, mit der Porenschleife zwischen dem 5. und dem 6. Segment, das aminoterminalen Ende mit den sechs Ankyrinwiederholungsdomänen (ANK1 - ANK6) sowie die Calmodulin-Bindungsdomäne (Cam) am carboxyterminalen Ende. Amino- und carboxyterminales Ende liegen zyttoplasmatisch.

Die Mechanosensitivität des Kanals scheint dabei auf die prolinreiche Region innerhalb der ersten Ankyrinwiederholungsdomäne zurückführbar zu sein [71, 72]. Im Ruhezustand soll eine intrazelluläre Domäne des N-Terminus einen autoinhibitorischen Komplex mit einer Calmodulin-bindenden Domäne des C-Terminus bilden [73].

Aktivierung und Hemmung

TRPV4 kann durch mechanische, chemische und osmotische Reize sowie Veränderungen der Temperatur aktiviert werden. Durch Entzündungsreaktionen kann die Empfindlichkeit dabei steigen [68]. Heute sind eine Reihe von Agonisten und Antagonisten bekannt. Die publizierten **Agonisten** sind 4 α PDD [74], 5,6-EET [75], Bisandrographolide

[76], RN-1747 [77] und GSK-1016790A [78]. Die Bindungsdomäne für Phorbolsterderivate konnte am N-Terminus des S3-Segmentes bestimmt werden [79].

Die bekannten **Antagonisten** sind Ruthenium-Rot [74], RN-1734 [77], RN-9893 [80], HC-067047 [60], Capsazepin [77], Citral [81] und GSK205 [82]. Das Stickstoffmonoxid hat eine cGMP-abhängige inhibitorische Wirkung auf TRPV4 [78]. Auch der Calcium-Calmodulinkomplex hat eine inhibierende und deaktivierende Wirkung auf den TRPV4 [73, 83].

Physiologische Funktionen

TRPV4 spielt eine wesentliche Rolle in vielfachen physiologischen Funktionen des Körpers und auch in der Pathophysiologie vieler Erkrankungen.

In der Nozizeption, insbesondere im Rahmen von Entzündungsreaktionen, werden dem Kanal die Detektion von Veränderungen der Osmolarität zugeschrieben [84].

Die Mechanosensitivität des Kanals ist für die durch Scherspannung induzierte Vasodilatation notwendig [85].

Der Kanal ist außerdem an Kollateralenbildung zur Vaskularisation hypoxischer Gewebe beteiligt [86]. Auch die Wichtigkeit für die pulmonale Vasokonstriktion in hypoxischen Lungenabschnitten konnte belegt werden [87].

Im Knochengewebe spielt der Kanal eine Rolle in der Regulation der stetigen Umbauprozesse und ist an der belastungsabhängigen Osteoklastenaktivierung beteiligt [88].

Im Endothel ist TRPV4 in die Aufrechterhaltung der zellulären Barriere involviert. Seine Aktivierung führt dabei zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität [78].

In Adipozyten wurde TRPV4 als Inhibitor des oxidativen Stoffwechsels und Aktivator eines proinflammatorischen Genprogramms gefunden. TRPV4-defiziente Mäuse zeigten dabei reduzierte Entzündungsreaktionen im Fettgewebe sowie eine höhere Sensitivität für Insulin. [62].

In TRPV4-defizienten Mäusen ist eine stark erhöhte Harnblasenkapazität nachgewiesen worden. Zudem zeigten diese Mäuse Blasenentleerungsstörungen. Eine Aktivierung des Kanals beim Wildtyp führte zu einer geringeren Blasenkapazität und einer höheren Frequenz der Entleerung. Es wird daher angenommen, dass TRPV4 an den sensorischen Funktionen des Urothels beteiligt ist [89].

Außerdem ist TRPV4 ein wichtiger mechanosensitiver Kationenkanal in Muskelfasern, oder ein relevanter Bestandteil solcher Kanäle [90]. Eine der Mutationen im *trpv4*-Gen

hat einen unabhängigen muskulären Phänotyp mit basophilen Einschlüssen in Muskelfasern [91]. Im über-erregten myotonen Muskel kann die Myotonie mechanisch induziert werden. Diese Reaktion wird durch TRPV4 vermittelt [92].

Krankheitsassoziationen

Störungen in der Kanalexprimierung und -regulation führen erwartungsgemäß zu vielfältigen Störungen im Organismus. Angeborene Mutationen im TRPV4-Gen haben dabei Skelettdysplasien und neuromuskuläre Störungen zur Folge [93].

Skelettdysplasien

Eine gain-of-function-Mutation im TRPV4-Gen führt zur Brachyolmie Typ 3 [94], einer dysplastischen Erkrankung der Wirbelsäule [95]. Eine geringere Zelloberflächenexpression des Kanals verursacht die familiäre digitale Arthropathie und Brachydaktylie [96]. Weitere assoziierte Skelettdysplasien sind die spondylometaphyseale Dysplasie vom Kozlowski-Typ [97], die spondyloepiphyseale Dysplasie vom Maroteaux-Typ, der parastremmatische Kleinwuchs [98] und die metatrophe Dysplasie [95, 99].

Neuromuskuläre Störungen

Landouere und Kollegen fanden 2010 einen Zusammenhang zwischen gestörter Expression von TRPV4 und der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit vom Typ 2C (CMT2C) [100]. Auer-Grumbach und Kollegen identifizierten die Mutationen, die zu den drei bekannten neuromuskulären Störungen führen. In ihren Experimenten konnten sie zeigen, dass Zellen, die mit den entsprechenden Mutanten transfiziert waren, auf keinerlei Stimulation von TRPV4 reagierten. Die Genprodukte kumulierten im Zytoplasma dieser Zellen. So konnten sie die genetischen Ursachen der CMT2C, der scapuloperonealen spinalen Muskelatrophie (SPSMA) und der kongenitalen distalen spinalen Muskelatrophie (CDSMA) aufklären [70].

Weitere assoziierte Erkrankungen und Syndrome

TRPV4 kann eine Rolle in vielen weiteren Störungen zugeschrieben werden. Für diverse Erkrankungen des Respirationstrakts wurden Fehlfunktionen der TRPV4-Proteine

postuliert. So ist der Kanal wesentlich an der Entstehung der idiopathischen Lungenfibrose beteiligt [101]. Baxter und Kollegen zeigten außerdem, dass TRPV4 die Pathophysiologie der COPD beeinflusst [102]. Auch für die Vasokonstriktion im Rahmen des Asthma bronchiale ist ein Zusammenhang anzunehmen [103]. Dazu tragen sie vermutlich zur Aufrechterhaltung der chronischen Sinusitis bei [104].

Die Zystenbildung in der autosomal-rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung wird durch Fehlfunktionen von TRPV4 unterhalten [105]. Der Kanal scheint dabei die Balance zwischen Natrium und Wasser als Osmorezeptor zu regulieren [106]. Eine loss-of-funktion-Mutation ist mit einer allgemeinen Hyponatriämie assoziiert [107].

Weiterhin verursachen TRPV4-Dysregulationen Harnblasenentleerungsstörungen [108], Hörminderung [109], Thermhyperalgesie [110] und eine Veränderung der metabolischen Kapazität sowie der Fasertypenzusammensetzung im Skelettmuskel [111].

Neuere Forschungen belegen außerdem eine gewichtige Rolle in der Entstehung der mechanisch induzierten Myotonie (Myotonia congenita Thomsen). Dupont und Kollegen konnten am Tiermodell zeigen, dass die Aktivierung von TRPV4 die Entstehung der Myotonie begünstigt, während die pharmakologische Hemmung des Kanals die Schwere der Erkrankung deutlich abmildern kann [92]. Nicht zuletzt aus diesen Ergebnissen ergeben sich weitere Fragen über die Rolle des Kanals in der Skelettmuskelphysiologie.

2 Fragestellung

Die Forschung der letzten Jahre hat erhebliche Erkenntnisse über die Bedeutung der TRP-Kanäle geliefert. So konnte auch ihre Rolle in einer Vielzahl von Erkrankungen gezeigt werden [112]. Es ist zudem bekannt, dass die TRP-Kanäle ubiquitär exprimiert werden. Das macht sie einerseits als pharmakotherapeutisches Ziel relevant, birgt aber andererseits ein mögliches Risiko vielfältiger Nebenwirkungen.

Der Einfluss auf die Pathophysiologie neuromuskulärer Erkrankungen wie der Muskeldystrophie Duchenne, die wesentlich durch eine gestörte Kalzium-Homöostase bestimmt ist, ist dabei besonders interessant. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass der TRPV4 im Sarkolemm von Wildtyp-Mäusen lokalisiert ist und dort den Calcium-Einstrom und die Ermüdbarkeit der Muskelzelle beeinflusst [65]. Im Mausmodell für die Muskeldystrophie Duchenne (*mdx*-Maus) konnte eine vermehrte Expression in der Kernmembran festgestellt werden [113].

Die Zusammenschau der Erkenntnisse wirft unter anderem die Frage auf, welche weiteren physiologischen Aufgaben TRPV4 im Skelettmuskel übernimmt und welche Konsequenzen mit einem Mangel an funktionstüchtigem Protein einhergehen. Letztere Frage ist dabei insbesondere relevant, um mögliche Nebenwirkungen einer Pharmakotherapie mit TRPV4-Blockern einschätzen zu können.

Außerdem ist im Mausmodell für die DMD eine fortschreitende Veränderung der Muskelstruktur bekannt (siehe Kapitel 1.2.1 und Abbildung 3). Diese Arbeit versucht, einen Beitrag zur Aufklärung der Rolle von TRPV4 in den dieser Entwicklung zugrunde liegenden pathophysiologischen Prozessen zu leisten. Hierzu werden die Konsequenzen eines Mangels an funktionsfähigem TRPV4-Protein untersucht. Es werden Faserkaliber, Kollagengehalt und Fasertypenzusammensetzung in TRPV4-defizienten Mäusen analysiert und mit dem korrespondierenden Wildtyp verglichen. Danach werden diese Parameter auch an *mdx*-Mäusen untersucht und dem entsprechenden Wildtyp gegenüber gestellt. Auf diesem Weg kann eine generelle Aussage darüber getroffen werden, welche Auswirkung das Fehlen von TRPV4 auf die Muskelstruktur hat. Außerdem können Unterschiede und Gemeinsamkeiten mit dystropher Muskulatur der *mdx*-Maus gezeigt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurde das Mausmodell gewählt und ausschließlich männliche Versuchstiere im Alter von 100 Tagen verwendet. Die *mdx*-Maus ist das allgemein akzeptierte Tiermodell für die Erforschung der Duchenne Muskeldystrophie. Die Punktmutation des Nukleotids 3185 im Exon 23 des für Dystrophin codierenden Gens erzeugt ein Stoppcodon [114]. Dadurch wird die Dystrophinsynthese nach 27% vorzeitig beendet und es entsteht ein verkürztes, nicht funktionales Dystrophin [12]. Auch die Proteine des Dystroglykan-Komplexes, der eine Verbindung zwischen Zytoskelett und extrazellulärer Matrix bildet, sind in diesem Modell um bis zu 80% reduziert [115]. Dennoch weisen die Skelettmuskeln der Versuchstiere kurz nach der Geburt keine histologischen Auffälligkeiten auf. Erst nach drei bis vier Wochen zeigen sich vermehrt zentrale Zellkerne als Zeichen der Faserregeneration [116] und erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel sowie erhöhte Werte der Creatinkinase (CK) im Blutplasma [117]. Die hier verwendete *mdx*-Maus entstand ursprünglich aus dem C57BL/10-Stamm (Wildtyp), mit dem die Ergebnisse der Versuche an *mdx*-Mäusen dieser Studie verglichen werden [118].

Der Arbeitsgruppe um Wolfgang Liedtke (Durham, USA) gelang die Entwicklung und Züchtung einer TRPV4-defizienten Maus (*trpv4*^{-/-}) aus dem C57BL/6J-Stamm [119]. Die Ergebnisse der Versuche an den *trpv4*^{-/-}-Modellen werden mit diesem Wildtyp verglichen. Im Folgenden werden für C57BL/6J und C57BL/10 die Abkürzungen BL/6J und BL/10 verwendet.

Die Tiere wurden dem Institut für Pathophysiologie freundlicherweise zur Verfügung gestellt und im Institut für Versuchstierkunde weitergezüchtet. Sie wurden in Standardkäfigen gehalten und erhielten Trockenfutter und Frischwasser aus Futterspendern zur Selbstentnahme. Das Institut besitzt eine entsprechende Genehmigung zur Verwendung der Mäuse.

3.2 Probenentnahme und Konservierung

Für die Untersuchungen wurden folgende Muskeln ausgewählt: M. tibialis anterior, M. soleus, M. extensor digitorum longus und das Diaphragma (Zwerchfell). Die drei Unterschenkelmuskeln wurden aufgrund ihrer bereits bekannten Diversität in ihren funktionsmorphologischen Eigenschaften ausgewählt. Das Zwerchfell als primärer Atemmuskel

ist im Krankheitsverlauf der Muskeldystrophie Duchenne besonders relevant (s. Kapitel 1.1.3).

Die Mäuse (n=4 für jeden der vier untersuchten Stämme) wurden durch zervikale Dislokation nach Diethylether-Anästhesie (Roth, Karlsruhe, Deutschland) getötet und jedem Tier die vier Muskeln entnommen. Um eine spätere autolytische Zersetzung zu verhindern, wurde das Gewebe vor dem Einfrieren in Shandon CryomatrixTM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) eingebettet. Die anschließende Konservierung der Muskeln erfolgte in flüssigem Stickstoff (Air Liquide Medical GmbH, Düsseldorf, Deutschland). Zur Reduzierung von Einfrierartefakten [120, 121] wurde der jeweilige Muskel in einem mit Petrolether (2-Methylbutan, Avantor, Radnor, Pennsylvania, USA) gefüllten Einfriergefäß in den Stickstoff abgesenkt. Der Stickstoff kühlt den Petrolether auf -110°C bis -120°C ab. Die Temperatur wurde mit einem Kälte-Laborthermometer der Firma Roth bestimmt. Die so eingefrorenen Proben konnten im Anschluss bei -80°C gelagert werden.

3.3 Anfertigung von Kryoschnitten

Die konservierten Muskelproben wurden im Kryostaten des Mikrotoms (Leica Frigocut 2800N, Reichert-Jung, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) zunächst mit Shandon CryomatrixTM-Flüssigkeit umorientiert. So konnten Muskelquerschnitte von $12\mu\text{m}$ Schichtdicke erzeugt und auf Superfrost-Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen werden. Derselbe Muskel konnte dabei für alle vier untersuchten Mausstämmen auf denselben Objektträger aufgebracht werden. So wurde sichergestellt, dass alle Präparate später nach exakt demselben Protokoll gefärbt werden würden. Die Objektträger wurden nach kurzer Trocknung erneut bei -80°C eingefroren.

3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine der wichtigsten Färbemethoden der Standardhistologie. Sie liefert kontrastreiche Übersichtsfärbungen, die auf der unterschiedlichen Affinität der beiden Farbstoffe zu verschiedenen Zellkompartimenten beruhen. Hämatoxylin ist ein basischer (kationischer) Farbstoff, bindet an anionische Komponenten wie DNA, RNA und sulfatierte Glykosaminoglykane und wird zur Kernfärbung eingesetzt. Das Eosin bindet als saurer, anionischer Farbstoff an die kationischen Komponenten des Zytoplasmas (Proteine, Mitochondrien, Granula). Im fertigen Präparat erscheinen die Kerne blau, das Zytoplasma je nach Anteilen der verschiedenen Kompo-

nenten in unterschiedlichen Abstufungen rötlich [122].

Zur Anfertigung des Präparats wurde der kurz bei Zimmertemperatur aufgetaute Objektträger zunächst für 10 Minuten in Hämalaulösung (Roth) verbracht und danach für 10 Minuten unter laufendem Leitungswasser gespült (gebläut). Nach Spülung mit destilliertem Wasser für 30 Sekunden wurde mit Eosin (Roth) für 3 Minuten gefärbt. Im Anschluss wurden die Präparate mit 96%igem Ethanol (CHEMSOLUTE, Renningen, Deutschland) und 100%igem Propanolol (CHEMSOLUTE) entwässert, mit Xylol (Rotipuran®), Roth) geklärt und mit ClarionTM Mounting Medium (Biomedica, Singapur) und einem Deckglas (Langenbrinck) eingedeckt.

3.5 Auswertung der HE-gefärbten Schnitte

Die HE-gefärbten Schnitte dienen zur Ermittlung des Feret-Durchmessers der Muskelfasern. Der Feret-Durchmesser ist definiert als kleinstmöglicher Abstand zweier paralleler Tangenten, die an die gegenüberliegenden Seiten einer Muskelfaser angelegt sind [123].

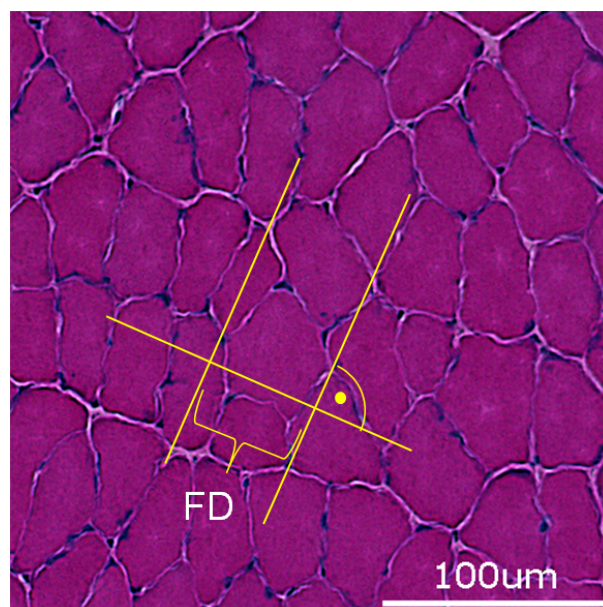


Abbildung 5: Beispielhafte Ermittlung des Feret-Durchmessers (FD) am M. soleus der Maus

Die Aufnahmen der Präparate wurden mit einem Lichtmikroskop (Nikon Eclipse E400, Nikon, Japan; HV-C20M, Hitachi Denshi Ltd., Japan) in 200-facher Vergrößerung angefertigt und digitalisiert. Die Messung der Feret-Durchmesser erfolgte mit dem experi-

mentellen Bildbearbeitungsprogramm *Image J*. Dieses Programm wurde an den National Institutes of Health (USA) entwickelt und wird ohne Urheberrechtsschutz angeboten. Die Feret-Durchmesser werden dabei als Strecke für jede Muskelfaser eingezeichnet und vom Programm nach entsprechender Kalibrierung vermessen. Auf diese Weise wurden Areale von $250\ \mu\text{m} \times 250\ \mu\text{m}$ jedes Muskels ausgewertet.

3.6 Sirius-Rot-Färbung

Mit der Sirius-Rot-Färbung lassen sich Kollagenstrukturen in histologischen Präparaten nachweisen. Der anionische Farbstoff *Sirius Rot* reagiert über seine sauren Sulfonsäure-Gruppen mit basischen Gruppen des Kollagenmoleküls. Die länglichen Farbstoffmoleküle lagern sich parallel an die Kollagenfasern an. Diese Beziehung zwischen Farbstoff und Kollagen führt zu einer Verstärkung der natürlichen Doppelbrechung des Lichts im Bereich der Kollagenfasern, dieser erscheint dann unter dem Mikroskop intensiv rot gefärbt. Die Zugabe von Pikrinsäure ermöglicht die kontrastreiche Darstellung des restlichen Gewebes [124].

Zur Herstellung der Färbelösung wurden 0.5 g des Farbstoffes SiriusRed F3B (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 500 ml 1,2%iger flüssiger Pikrinsäure (2,4,6-Trinitrophenol, Fagron, Glinde, Deutschland) gelöst. Die Lösung wurde für mindestens 30 Minuten über $60\ ^\circ\text{C}$ erhitzt und über Nacht bei Zimmertemperatur abgekühlt. Anschließend wurde mit ca. 5 mg Pikrinsäure-Pulver (Sigma Aldrich) bis zum Ausfallen von Kristallen aufgesättigt.

Die zur Färbung vorgesehenen Objektträger wurden zunächst bei Zimmertemperatur aufgetaut und für 30 Sekunden in 96%igem Ethanol fixiert. Nach kurzer Trocknung wurde unter Verwendung eines Schüttlers (VXR basic, IKA, Staufen, Deutschland) für 60 Minuten in der Färbelösung inkubiert. Danach wurde zweifach in 0,5%iger Essigsäure gewaschen und nach der bereits für die HE-Färbung beschriebenen Methode entwässert, geklärt und eingedeckt.

3.7 Auswertung der Sirius-Rot-gefärbten Schnitte

Die Sirius-Rot-gefärbten Schnitte wurden mit der Licht-/Polarisationsmikroskopie-Funktion eines Fluoreszenzmikroskops (Microscope BZ-X, Keyence, Japan) aufgenommen und digitalisiert und mit der zugehörigen Software *BZ-II Analyser* ausgewertet. Das Programm stellt dazu eine Funktion zur Flächenkontrastierung und -vermessung bereit. Pro Tier wurden fünf Areale zu je $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ ausgewertet und gemittelt. Auf diese Weise

wurde der Anteil von Bindegewebe für alle Präparate ermittelt.

3.8 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung erlaubt die Fasertypisierung im murinen Skelettmuskel. Das Prinzip der Färbung beruht dabei auf der Markierung eines für einen bestimmten Fasertypen spezifischen MHC-Moleküls (Myosin schwere Kette) durch einen entsprechenden Antikörper (primärer Antikörper), an den wiederum ein zweiter, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter Antikörper bindet (sekundärer Antikörper). Bei Betrachtung unter einem Fluoreszenzmikroskop erscheinen dann die unterschiedlichen Fasertypen farblich codiert. Auf diese Weise können die Fasertypen I, IIA, IIB und IIX differenziert werden.

	Fasertyp			
	I	IIA	IIB	IIX
Antigen	MHCI	MHCIIa	MHCIIb	MHCIIx
primärer Antikörper	BA-F8	SC-71	BF-F3	6H1
Verdünnung	1:100	1:100	1:50	1:50
sekundärer Antikörper	Alexa Fluor 350 IgG _{2b}	Alexa Fluor 488 IgG ₁	Alexa Fluor 555 IgM	Alexa Fluor 555 IgM
Verdünnung	1:500	1:500	1:500	1:500
Farbe	blau	grün	rot	rot

Tabelle 3: Färbeprotokoll zur immunhistochemischen Fasertypisierung, modifiziert nach [26]

Zur Anfertigung der Fluoreszenzpräparate wurden die verwendeten Objektträger zunächst bei Zimmertemperatur aufgetaut und die darauf aufgebrachtten Präparate gemeinsam mit einem Fettstift umrandet und zweimal für fünf Minuten in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Biochrom, Berlin, Deutschland) gewaschen. Zur Absättigung unspezifisch proteinbindender Flächen erfolgte eine Blockierung mit bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma Aldrich) über Nacht (4% BSA in PBS). Im Anschluss wurde mit dem primären Antikörper nach der in der Tabelle 3 aufgeführten Verdünnung (in 4% BSA/PBS) für eine Stunde in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 3 x 15 Minuten mit PBS gewaschen. Die primären Antikörper wurden aus der Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB, Iowa, USA) bezogen. Danach konnte mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung nach Tabelle 3 in 4% BSA/PBS, Bezug der sekundären Antikörper von Thermo Fisher Scientific) ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert werden. In diesem Schritt wurde der Inkubationslösung au-

ßerdem der DNA-Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Roth) zugegeben. Nach erneutem Waschen für 3 x 15 Minuten mit PBS und Spülung für 5 Minuten unter Leitungswasser erfolgte die Eindeckung mit einem glycerolbasierenden mounting-Medium (DABCOTM, Merck, Darmstadt, Deutschland).

3.9 Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte

Die Begutachtung der so gefärbten Muskelquerschnitte erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Microscope BZ-X, Keyence). Da dieses Mikroskop vier Kanäle zur Fluoreszenzmikroskopie bereitstellt, zur Auswertung hier jedoch fünf (BA-F8, SC-71, BF-F3, 6H1, DAPI) benötigt wurden, wurde die Untersuchung in einem ersten Durchgang unter Verwendung von BF-F3, SC-71, BA-F8 und DAPI durchgeführt und in einem zweiten Durchgang an einem folgenden Muskelschnitt unter Verwendung vom SC-71, 6H1 und DAPI wiederholt. Durch die Auswahl direkt benachbarter Muskelschnitte konnte sichergestellt werden, dass die ausgewerteten Muskelfasern auf den verschiedenen Objektträgern nachvollziehbar und vergleichbar blieben. Die Auswahl der Antikörper-Konstellation in den Inkubationslösungen ermöglichte eine Auswertung auch in Hinblick auf die weiter oben beschriebenen Fasertypen-Hybriden. Die Aufnahmen konnten mit der Software *BZ-II Analyser* erstellt und gespeichert werden. Hier wurden vergleichbare Areale von $250\ \mu\text{m} \times 250\ \mu\text{m}$ jedes Muskelquerschnitts ausgewertet.

3.10 Digitalisierung und Erstellung der Diagramme und Abbildungen

Die erhobenen Daten wurden im Programm Microsoft®Office Excel®2007 in Tabellenform eingetragen. Mittelwerte und Standardabweichungen konnten mit den entsprechenden Funktionen des Programms berechnet werden. Die im Ergebnisteil verwendeten Diagramme zur Ergebnisdarstellung wurden ebenfalls mit diesem Programm erstellt und zur Formatierung und Ergänzung der statistischen Auswertung mit der Grafiksoftware Microsoft®Paint bearbeitet. Die gezeigten Bildbeispiele der Muskelquerschnitte wurden mit Microsoft®Office PowerPoint®2007 arrangiert. Das vorliegende Dokument wurde mit dem LaTeX Texmaker erzeugt und die Literaturdatenbank aus dem frei verfügbaren Literaturverwaltungsprogramm JabRef eingebettet (BibTex).

3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Faserkaliber erfolgte durch Überprüfung von Abweichungen der Varianz mittels F-Test [125] der jeweiligen Mutanten im Vergleich mit ihren Wildtypen auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ - sofern nicht anders angegeben. Die Überprüfung auf Normalverteilung der Messwerte erfolgte zuvor mittels Shapiro-Wilk-Test.

Die statistische Auswertung der Analyse des Kollagengehalts erfolgte mit dem „nonparametric test of location“ nach Rosenbaum [126] auf dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Statistisch signifikante Abweichungen sind in den Abbildungen durch ein Sternchen (*) hervorgehoben.

Zur statistischen Auswertung der Fasertypisierung wurde ebenfalls Rosenbaums Schnelltest mit dem Signifikanzniveau $p < 0,05$ herangezogen und ein Sternchen (*) zur Veranschaulichung signifikanter Unterschiede in den Diagrammen platziert.

3.12 Fehlerbetrachtung

Die zur Auswertung herangezogenen Versuchsobjekte wurden nach höchsten wissenschaftlichen Standards gezogen und bearbeitet. Grobe Fehler in der Anfertigung und Interpretation der Präparate können dank größter Sorgfalt in der Umsetzung der oben beschriebenen Materialgewinnung sowie Anfertigung und Färbung der Proben ausgeschlossen werden.

Aufgrund des hohen experimentellen Aufwands ist die Stichprobe der Tiere (4 pro Stamm) dabei relativ gering gewählt. Diese Versuchsanordnung ist anfällig für Ergebnisverfälschungen durch extrem hohe oder niedrige Stichproben („Ausreißer“). Diesem Problem wurde begegnet, indem in jedem Stamm vergleichbare und sehr große Areale ausgewertet wurden, um eine hohe Anzahl an Stichproben pro Tier zu gewinnen.

Die Interpretation der Präparate wurde für die Vermessung der Faserkaliber und die Berechnung des Kollagengehalts nach oben beschriebenem Verfahren computergestützt durchgeführt. Dabei war das Prozedere für jeden Muskel jedes Tieres standardisiert und dadurch vergleichbar. Fehler, die hier im technischen Messvorgang selbst liegen, lassen sich nur über eine Erhöhung der Stichprobe kompensieren. Die Auswertung der Präparate zur Fasertypisierung erfolgte unter größter Sorgfalt durch manuelles Auszählen vorher definierter Areale. Dabei lässt sich eine Unvollkommenheit des Untersuchers nie mit letzter Gewissheit ausschließen. Zur Minimierung des Risikos zufälliger Fehler erfolgte die Auszählung jeweils mehrfach.

4 Ergebnisse

Die folgenden Ergebnisse wurden am 03. März 2016 auf der 95. Jahrestagung der „*Deutsche Physiologische Gesellschaft*“ in Lübeck vorgetragen und von Fachpublikum diskutiert.

Die Ergebnisse der Analysen von Faserkaliber, Kollagengehalt und Fasertypisierung werden für die vier untersuchten Muskeln und Genotypen jeweils nacheinander präsentiert. Dabei wird an dieser Stelle zur Verbesserung der Übersicht und Lesbarkeit weitestgehend auf die Darstellung von Zahlenwerten in den Grafiken verzichtet. Diese werden im Anhang tabellarisch aufgeführt.

4.1 Faserkaliber

Die Abbildung 6 zeigt beispielhaft Muskelquerschnitte des M. soleus, an denen die Messungen durchgeführt wurden.

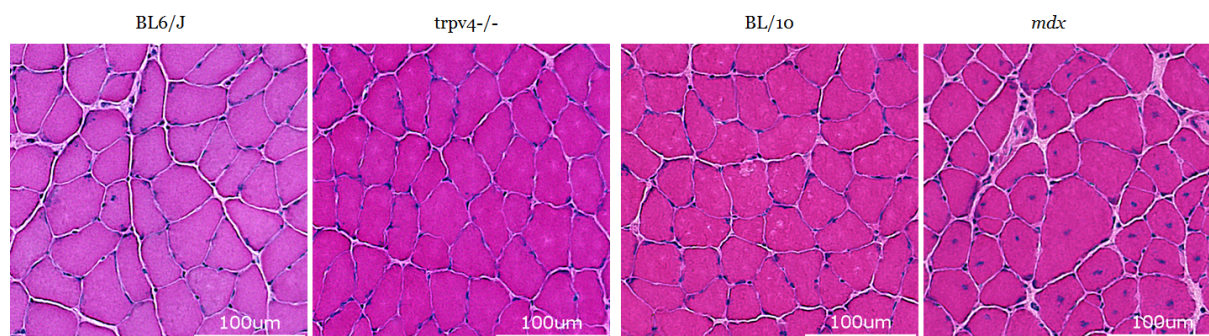


Abbildung 6: Die Abbildung zeigt für jeden untersuchten Stamm beispielhaft ausgewählte Muskelareale (M. soleus, Hämatoxylin-Eosin-Färbung) im Querschnitt, an denen die Messungen der Feret-Durchmesser erfolgten.

Bereits an den beispielhaft ausgewählten Querschnitten imponiert in der *mdx*-Mutante ein heterogenes Bild in Bezug auf Faserkaliber, Kollagengehalt und Lokalisation der Zellkerne.

Die Vermessung der Faserkaliber erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Die Ergebnisse werden für jeden untersuchten Muskel der 4 untersuchten Mausstämmen grafisch aufgetragen. Dabei wird der Anteil von Muskelfasern eines auf der X-Achse definierten

Durchmessers in Prozent unter ebenfalls grafisch dargestellter Angabe der Standardabweichung bei n=4 angegeben.

4.1.1 M. soleus

In der Ermittlung der Faserkaliber (Minimaler Feret-Durchmesser) ergaben sich für den M. soleus der vier untersuchten Mausstämme am häufigsten mittlere Durchmesser zwischen 30 und 40 Mikrometern. Für die *mdx*-Mutante wurde die vorbeschriebene Dissemination als Ausdruck schwankender Faserkaliber (wiederum Ausdruck aktiver regenerativer Prozesse) nachgewiesen.

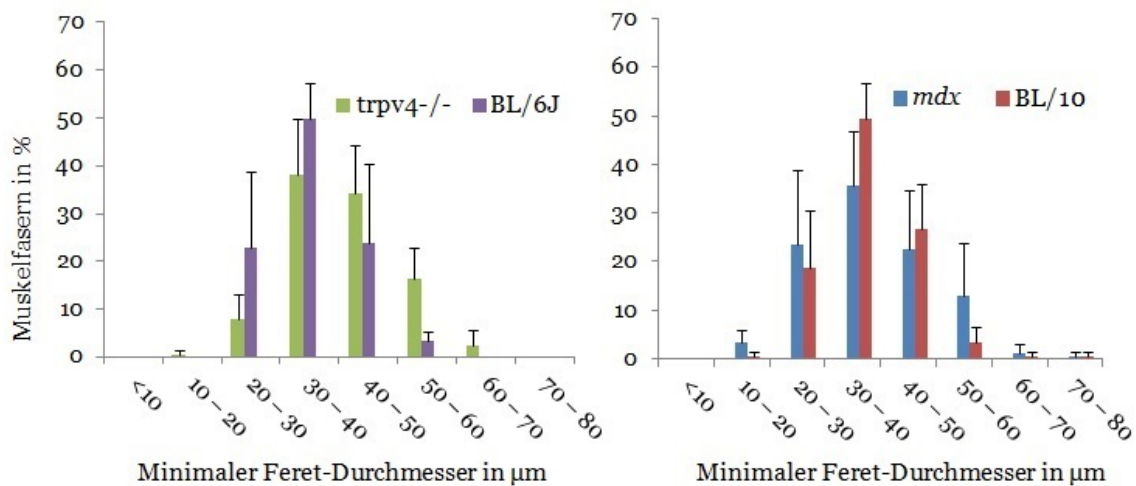


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der Faserkaliber in den Mm. solei der vier Genotypen. Für die Auswertung wurden Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Muskelquerschnitte (s. Abb. 6) herangezogen und Mittelwerte \pm SD von n=4 Muskeln pro Genotyp dargestellt. Minimale Feret-Durchmesser von n=200 Fasern wurden bestimmt. Die statistische Auswertung zur Überprüfung von Abweichungen der Varianz erfolgte mittels F-Test. Auf dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Varianz sowohl für den Vergleich von *mdx* und BL/10 als auch für den Vergleich zwischen *trpv4*^{-/-} und BL/6.

Das Diagramm in Abbildung 7 veranschaulicht das vermehrte Auftreten von Fasern mit geringerem (10-20µm) und größerem (50-60µm) Feret-Durchmesser in der *mdx*-Mutante. Dabei ergab sich in der statistischen Auswertung ein signifikanter Unterschied der Varianz (F-Test) sowohl auf dem Signifikanzniveau von 0,05, als auch auf dem Niveau von 0,01 ($p = 0,0001072$). Für den Vergleich der TRPV4-defizienten Mutante mit

ihrem Wildtyp ergab sich ein signifikanter Unterschied auf dem Niveau von 0,05, aber nicht auf dem Niveau von 0,01 ($p = 0,02065$).

4.1.2 M. tibialis anterior

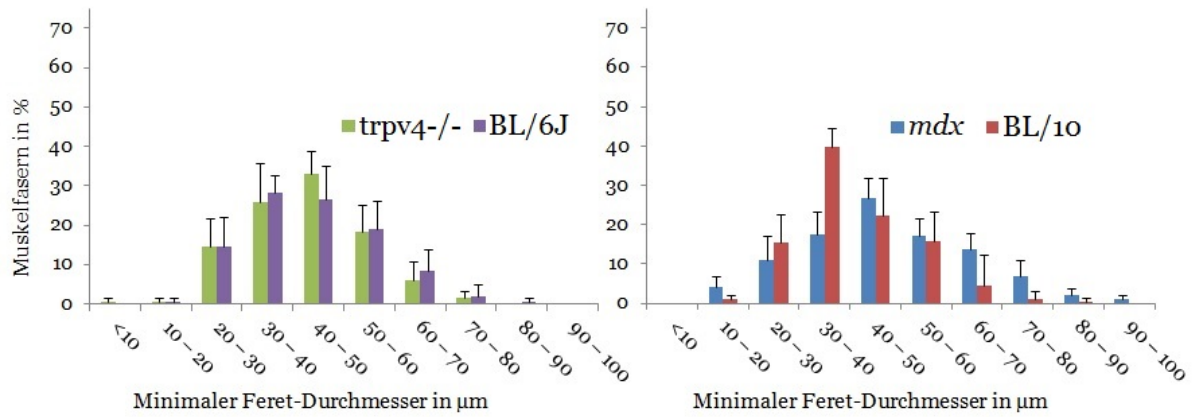


Abbildung 8: Häufigkeitsverteilung der Faserkaliber im M. tibialis anterior. Die Auswertung erfolgte wie unter Abb. 7 beschrieben. Auf dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Varianz für den Vergleich von *mdx* und BL/10, aber kein signifikanter Unterschied zwischen *trpv4*^{-/-} und BL/6.

Im M. tibialis anterior ergaben sich am häufigsten Faserkaliber zwischen 30-50 μm ohne statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich der *trpv4*^{-/-}-Mutante mit ihrem Wildtyp ($p = 0,128$). In der *mdx*-Mutante zeigt sich im Vergleich zum Wildtyp erneut eine signifikant ausgeprägtere Dissemination der Faserkaliber mit erhöhtem Auftreten von sehr schmalen und sehr breiten Fasern ($p = 3,056 \cdot 10^{-7}$)

4.1.3 M. extensor digitorum longus

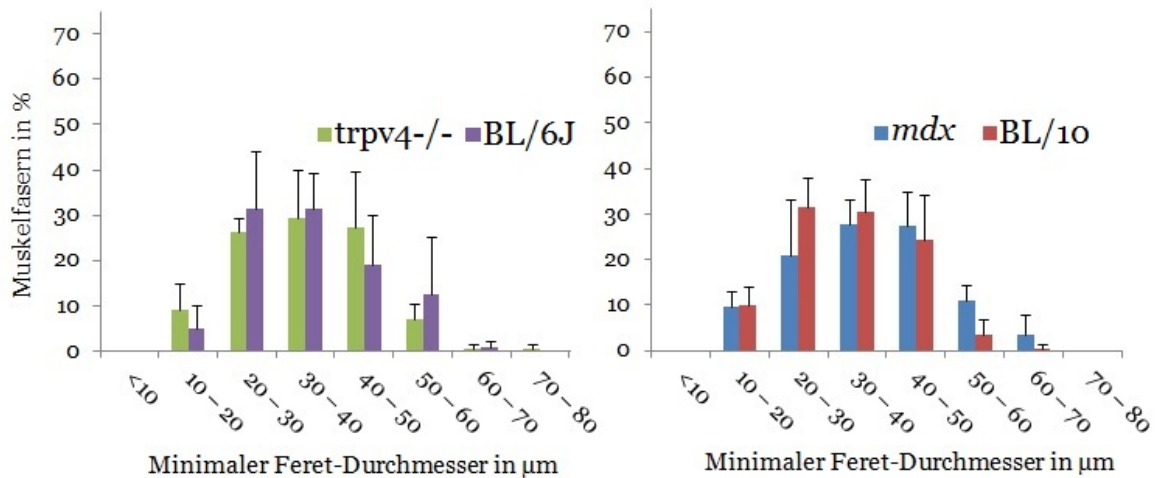


Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der Faserkaliber im M. extensor digitorum longus. Die Auswertung erfolgte wie unter Abb. 7 beschrieben. Auf dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Varianz für den Vergleich von *mdx* und BL/10, aber kein signifikanter Unterschied zwischen *trpv4*^{-/-} und BL/6.

Im musculus extensor digitorum longus fand sich in allen vier untersuchten Mausstämmen eine ähnliche Verteilung der Faserkaliber. Im Vergleich der TRPV4-defizienten Mutante mit ihrem Wildtyp ergab sich dabei kein statistisch signifikanter Unterschied der Varianz ($p = 0,5313$). Für die *mdx*-Mutante ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,007922$), der sich im Diagramm der Abbildung 9 an einem deutlich höheren Anteil an Fasern mit größerem Feret-Durchmesser (50 - 70 μm) nachvollziehen lässt.

4.1.4 Diaphragma

Das Zwerchfell unterscheidet sich von den untersuchten Unterschenkelmuskeln durch ein insgesamt geringeres Faserkaliber (mittlerer minimaler Feret-Durchmesser zwischen 20-30 μm in allen 4 Stämmen). In der *mdx*-Mutante konnte ein geringer Anteil von Fasern mit einem Feret-Durchmesser von $<10 \mu\text{m}$ nachgewiesen werden, der in dem korrespondierenden Wildtyp nicht auftrat.

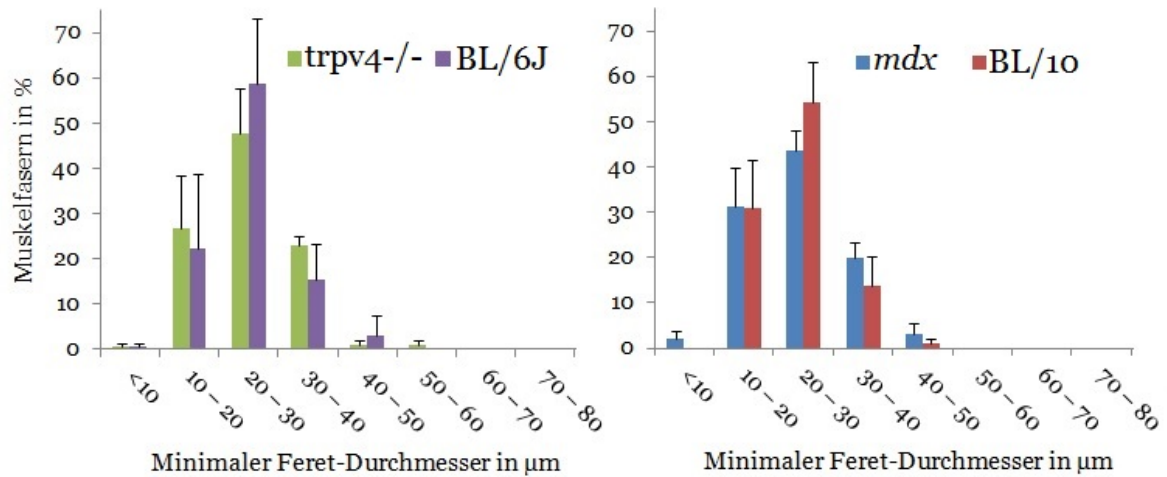


Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung der Faserkaliber im Diaphragma. Die Auswertung erfolgte wie unter Abb. 7 beschrieben. Auf dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Varianz für den Vergleich von *mdx* und BL/10, aber kein signifikanter Unterschied zwischen *trpv4*^{-/-} und BL/6.

In der statistischen Auswertung ergab sich kein signifikanter Unterschied der Varianz zwischen *trpv4*^{-/-}-Mutante und ihrem Wildtyp ($p = 0,1559$). Im Vergleich der *mdx*-Mutante mit ihrem Wildtyp ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,004285$).

4.2 Kollagengehalt

Die Abbildung zeigt beispielhaft Sirius-Rot-gefärbte Muskelquerschnitte des M. soleus, an denen die Messungen durchgeführt wurden.

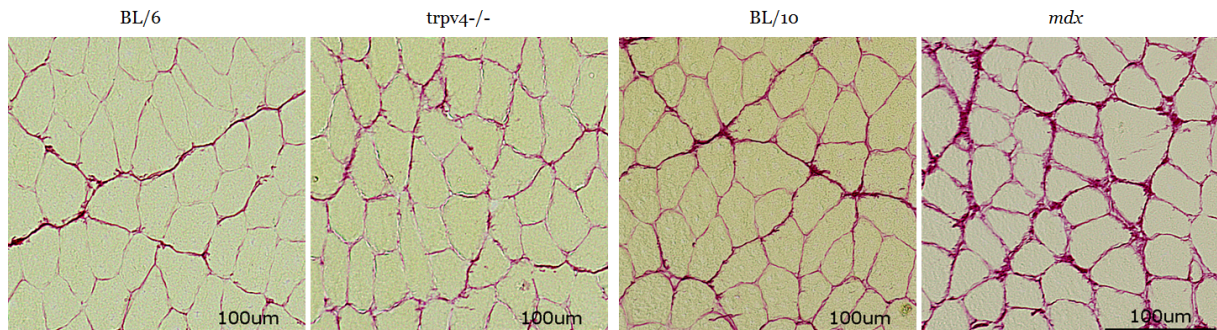


Abbildung 11: Kollagengehalt am Beispiel Sirius-Rot-gefärbter Muskelquerschnitte der Mm. solei der 4 Genotypen

Das Ausmaß der so zu messenden fibrotischen Areale lässt einen Rückschluss auf bindegewebige Faserdegeneration zu. Für alle vier untersuchten Muskeln wurde der Anteil an Kollagen an der Gesamtfläche nach oben beschriebener Methode untersucht und die beiden betrachteten Mutanten mit ihrem korrespondierenden Wildtyp verglichen. Die Ergebnisse sind dabei für die vier Stämme in einem Diagramm aufgetragen.

4.2.1 M. soleus

Für den musculus soleus ergab sich in der *mdx*-Mutante erwartungsgemäß ein etwa doppelt so großer prozentualer Anteil an kollagenhaltigem (fibrotischem) Areal wie im entsprechenden Wildtyp (BL/10). Für den Vergleich der TRPV4-defizienten Maus mit ihrem Wildtyp (BL/6J) ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied feststellen.

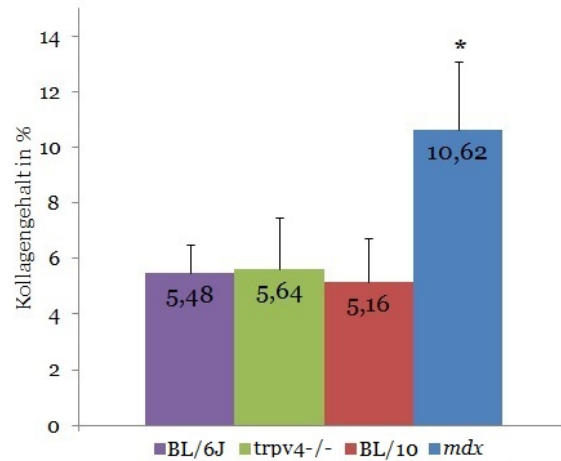


Abbildung 12: Kollagengehalt M. soleus. Die Daten basieren auf der Sirius-Rot gefärbten Fläche im Vergleich zur gesamten Querschnittsfläche (s. Abb. 11) in den Mm. solei der vier Genotypen. Angegeben wird die Sirius-Rot gefärbte Fläche in Prozent als Mittelwert \pm SD von $n=4$ Muskeln pro Genotyp. Es wurden pro Tier fünf vergleichbare Flächen von $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ ausgewertet. Signifikante Unterschiede auf dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ werden durch * gekennzeichnet.

4.2.2 M. tibialis anterior

Im musculus tibialis anterior zeigte sich in den untersuchten Stämmen eine ähnliche prozentuale Verteilung fibrotischer Areale wie im zuvor untersuchten musculus soleus. Im Vergleich der *mdx*-Mutante mit ihrem Wildtyp ergab sich ebenso ein etwa doppelt so großer Anteil an kollagenhaltigen Arealen, während die TRPV4-defiziente Mutante hier keinen signifikanten Unterschied gegenüber ihrem Wildtyp aufwies.

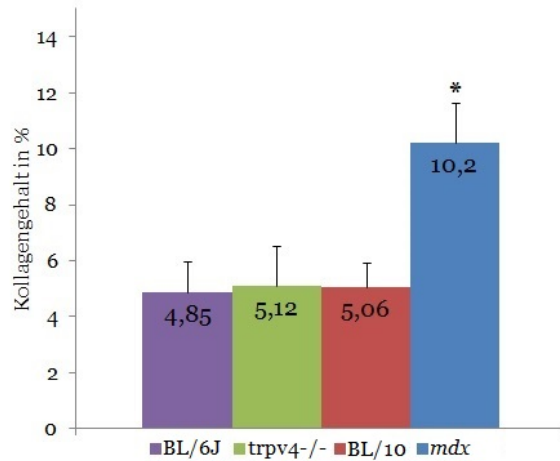


Abbildung 13: Kollagengehalt M. tibialis anterior. Die Auswertung erfolgte wie unter Abb. 12 beschrieben.

4.2.3 M. extensor digitorum longus

Auch im musculus extensor digitorum longus ergab sich in der TRPV4-defizienten Mutante kein signifikanter Unterschied zu ihrem Wildtyp, während sich in der *mdx*-Mutante ein signifikant erhöhtes Ausmaß an kollagenhaltigem Gewebe feststellen ließ.

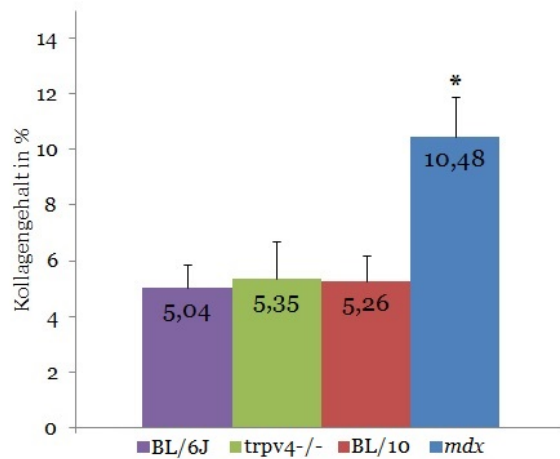


Abbildung 14: Kollagengehalt M. extensor digitorum longus. Die Auswertung erfolgte wie unter Abb. 12 beschrieben.

4.2.4 Diaphragma

Im Diaphragma konnte in der *trpv4*^{-/-}-Mutante ein leicht erhöhter Anteil an Kollagen gegenüber ihrem Wildtyp ermittelt werden (5,36% gegenüber 4,30%). Dieser Unterschied war in der statistischen Auswertung nicht signifikant. Im Diaphragma war der fibrotische Anteil in der *mdx*-Mutante, verglichen mit ihrem Wildtyp dabei noch stärker erhöht als in den untersuchten Unterschenkelmuskeln (11,47% gegenüber 4,46%).

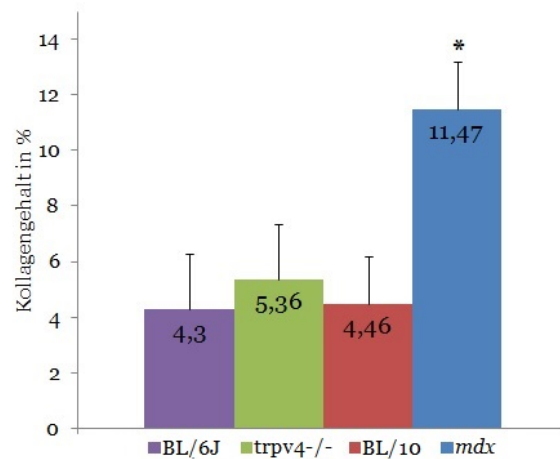


Abbildung 15: Kollagengehalt Diaphragma. Die Auswertung erfolgte wie unter Abb. 12 beschrieben.

4.3 Fasertypisierung

Die Abbildung 16 zeigt beispielhaft Querschnitte des Diaphragmas, die nach oben beschriebenen Protokoll mit den Antikörpern BA-F8 (Typ I), SC-71 (Typ IIA), BF-F3 (Typ IIB) und DAPI (DNA) inkubiert wurden. Die Fasern des Typs IIX waren in einer zweiten Färbung nach Inkubation mit dem Antikörper 6H1 identifiziert worden.

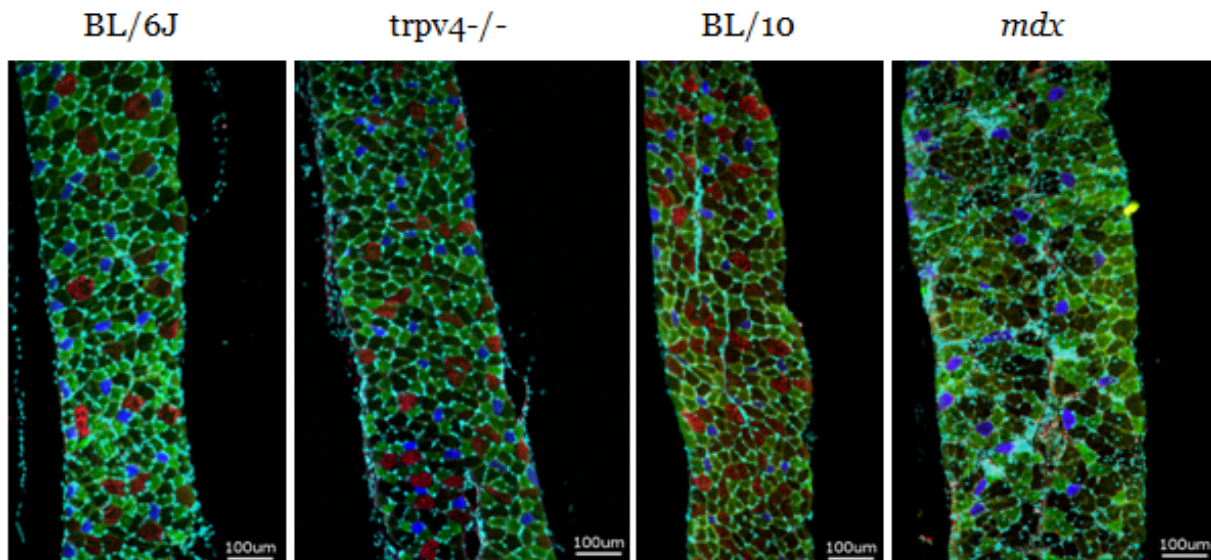


Abbildung 16: Fasertypisierung am Beispiel immunhistochemisch gefärbter Muskelquerschnitte des Diaphragmas der 4 Genotypen. Für diese beispielhafte Abbildung wurde das Diaphragma ausgewählt, bei dem die Veränderungen im *mdx*-Modell besonders eindrücklich nachvollziehbar sind. Gezeigt ist die Identifikation der Fasertypen mit den primären Antikörpern BA-F8, SC-71, BF-F3 und DAPI. Die Fasern vom Typ 1 erscheinen blau, Typ IIA grün, Typ IIB rot und die Zellkerne türkis. Die Fasern vom Typ IIX erscheinen ungefärbt und wurden in einer zweiten Färbung mit dem primären Antikörper 6H1 identifiziert.

In den verwendeten Diagrammen werden die Vergleiche der *trpv4*^{-/-}-Mutante mit ihrem Wildtyp BL/6J und der *mdx*-Mutante mit BL/10 separat dargestellt. Dabei ist auf der X-Achse das zur Fasertypisierung nachgewiesene MHC-Molekül angegeben. Die Sortierung erfolgte nach Kontraktionsgeschwindigkeit von links nach rechts unter Berücksichtigung der beschriebenen Fasertypen-Hybriden. Die Y-Achse ist mit dem prozentualen Anteil der entsprechenden Fasern definiert.

4.3.1 M. soleus

Der musculus soleus zeichnet sich bekanntermaßen durch einen hohen Anteil an Typ-I- und Typ-IIA-Fasern aus und erfüllt daher im Wesentlichen Funktionen, die eine dauerhafte Kraftentwicklung erfordern (Haltungsstabilität) [26].

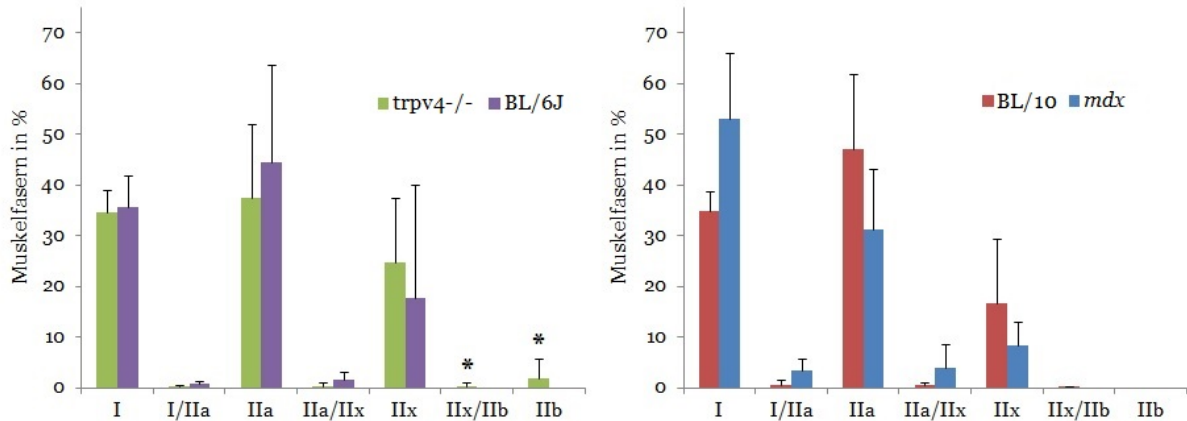


Abbildung 17: Häufigkeitsverteilung der Fasertypen in den Mm. solei der 4 Genotypen. Für die Auswertung wurden immunhistochemisch gefärbte Muskelquerschnitte (s. Abb. 16) herangezogen und Mittelwerte \pm SD von $n=4$ Muskeln pro Genotyp dargestellt. Pro Muskelquerschnitt wurden Areale von $250\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$ ausgewertet. Es werden die untersuchten Mutanten ($\text{trpv4}^{-/-}$ und mdx) ihrem korrespondierenden Wildtyp gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) werden durch * hervorgehoben.

Das Diagramm der Abbildung 17 suggeriert den in der mdx -Mutante bekannten Fasertypen-Shift in Richtung langsamerer Typ-I-Fasern. In der statistischen Auswertung war für diese Versuchsanordnung die Zunahme der Typ-I-Fasern nicht groß genug, um signifikant zu sein. Im Vergleich der TRPV4-defizienten Mutante mit ihrem Wildtyp BL/6J zeigte sich diese Umverteilung nicht, allerdings fand sich in der Mutante ein geringer Anteil an schnellen Fasern der Typen IIX und IIX/IIb, die im Wildtyp nicht nachgewiesen wurden.

4.3.2 M. tibialis anterior

Im musculus tibialis anterior dominieren Typ-IIX-Fasern (hohe Kontraktionsgeschwindigkeit, schnelle Ermüdung). Der Muskel erfüllt daher Aufgaben, die schnelle und kurze

Aktionen erfordern (hauptsächlich Fußhebung beim Laufen). In der Literatur wird der Muskel in einen roten (geringer Anteil von Typ-I-Fasern) und einen weißen (ausschließlich Typ-II-Fasern) Bereich unterteilt [26]. Um eine Vergleichbarkeit sicherzustellen, wurde in allen Muskeln der rote Bereich ausgewählt.

In allen untersuchten Muskeln wurde dabei die erwartete Dominanz von Typ-II-Fasern nachgewiesen, die durch die Masse an schnellen Typ-IIX- und Typ-IIB-Fasern gebildet wird. Typ-I-Fasern wurden in geringer Zahl in der *mdx*-Mutante und -in noch geringerem Ausmaß- in ihrem zugehörigen Wildtyp nachgewiesen.

Das Diagramm in Abbildung 18 belegt dabei die Verteilung über die Typ-II-Fasern mit Dominanz der Typ-IIX-Gruppe. Dabei finden sich in beiden Mutanten keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Fasertypen im Vergleich zu ihren korrespondierenden Wildtypen. Zudem konnten in allen vier Genotypen Hybrid-Fasern (vornehmlich Typ IIA/IIX und Typ IIX/IIB) detektiert werden, ebenfalls ohne signifikanten Unterschied zwischen Wildtypen und untersuchten Mutanten.

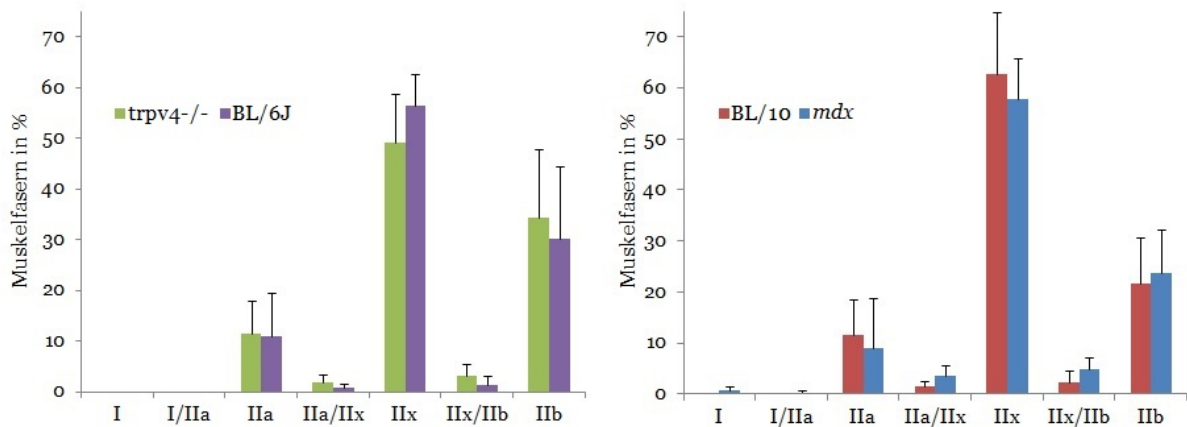


Abbildung 18: Häufigkeitsverteilung der Fasertypen in den Mm. tibiales anteriores der 4 Genotypen. Die Auswertung erfolgte wie unter Abb. 17 beschrieben.

4.3.3 M. extensor digitorum longus

Im musculus extensor digitorum longus überwiegen anteilig die schnellsten Fasern vom Typ IIX. Typ-I-Fasern kommen in den Wildtypen nicht vor. Der Muskel erfüllt damit Aufgaben, die einer raschen Kontraktion bedürfen (Zehen- und Fußhebung beim Laufen).

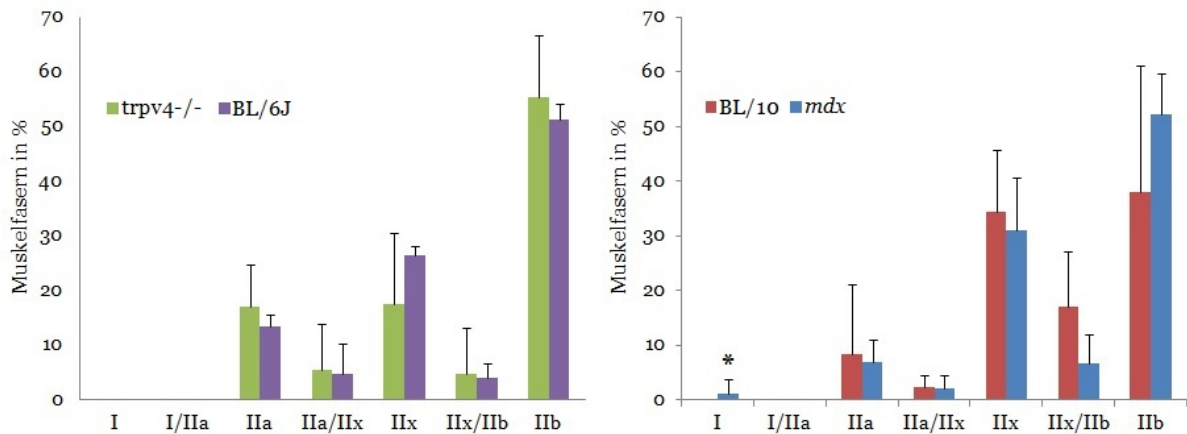


Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung der Fasertypen in den Mm. extensores digitorum longi der 4 Genotypen. Die Auswertung erfolgte wie unter Abb. 17 beschrieben.

Das Diagramm in Abbildung 19 veranschaulicht die Verschiebung der Fasertypen in Richtung langsamerer Fasern in der *mdx*-Mutante im Vergleich mit ihrem Wildtyp. Als Ausdruck dieser Verschiebung wurden in dieser Mutante langsam kontrahierende Typ-I-Fasern nachgewiesen, die sich in den übrigen Stämmen nicht fanden. Allerdings ergab sich auch ein höherer Anteil an schnellen Typ-IIb-Fasern (in der statistischen Überprüfung nicht signifikant), der ein Ausdruck für regenerative und kompensatorische Prozesse sein könnte. Für die *trpv4^{-/-}*-Mutante ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Fasertypen-Zusammensetzung im Vergleich mit dem Wildtyp.

4.3.4 Diaphragma

Im Diaphragma als wichtigstem Atemmuskel finden sich in den Wildtypen überwiegend (<90%) Typ-II-Fasern, die sich größtenteils aus den Typen IIA und IIX zusammensetzen. Dabei ist aber auch ein ausgeprägter Anteil an Typ-I-Fasern vorhanden, um die unterschiedlichen Anforderungen an die Zwerchfellatmung erfüllen zu können.

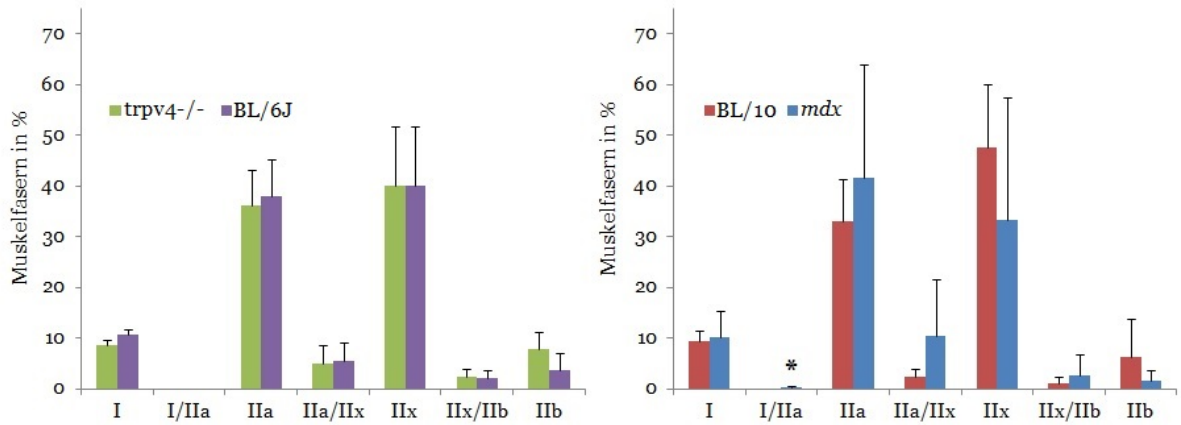


Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung der Fasertypen in den Diaphragmata der 4 Genotypen. Die Auswertung erfolgte wie unter Abb. 17 beschrieben.

Das Diagramm in Abbildung 20 stellt eine nahezu identische Zusammensetzung des Diaphragmas für die TRPV4-defiziente Mutante und ihren Wildtyp dar. In der *mdx*-Mutante suggeriert die Grafik einen leichten Shift von Typ IIX zu Typ IIA, der in der statistischen Überprüfung nicht signifikant war. Der Anteil der ausdauernden Typ-I-Fasern stellte sich konstant dar.

5 Diskussion

Die gewichtige Rolle der TRP-Kanäle in vielfältigen Krankheitsbildern ist aktuell Gegenstand verschiedenster Forschung. Dabei ist das therapeutische Potential vielversprechend, insbesondere bei Lungenerkrankungen wie Husten, Bronchokonstriktion, pulmonaler Hypertension und akuter respiratorischer Insuffizienz. Aber auch bei chronischen Schmerzerkrankungen, Ödemen und gastrointestinalen Störungen bestehen mögliche pharmakologische Behandlungsansätze [103]. Die Bedeutung der TRP-Kanäle für die Physiologie der Skelettmuskulatur sowie die für die Pathophysiologie ihrer Erkrankungen ist hingegen weitestgehend ungeklärt. Der Nachweis seiner Mechanosensitivität [43] rückt das TRPV4-Protein innerhalb dieser Gruppe in den Fokus der Muskeldystrophieforschung.

Bekanntermaßen ist die Erhöhung der Kalziumionen-Konzentration in der Muskelzelle unbedingte Voraussetzung für die Kontraktion des Muskels. Nach dem Nachweis funktioneller TRPV4-Proteine als Kationen-Kanäle [65] sollte sich deren Stellenwert für die physiologischen Prozesse und die funktionsmorphologische Entwicklung des Skelettmuskels in dieser Arbeit weiter genähert werden. Diese Untersuchungen sind dabei aus zwei Gründen interessant. Zum einen in Bezug auf die direkte Beteiligung des Kanals an pathophysiologischen Prozessen und zum anderen zur Aufklärung unerwünschter Wirkungen einer (pharmakologischen) Hemmung. Zu diesem Zweck sind hier die oben beschriebenen histologischen Untersuchungen sowohl an einem TRPV4-defizienten Mausmodell, als auch an einem Modell für eine der häufigsten genetischen Skelettmuskelerkrankungen - der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne- durchgeführt worden.

In der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne folgt die aktuelle Hypothese zur Ätiologie zwei Hauptkonzepten. Zum Einen verursacht die Dystrophin-Defizienz Schäden an der Zellmembran [127], die über einen vermehrten Kalziumeinstrom zur Aktivierung von Proteasen und Lipasen führt [128]. Daraus resultiert eine zusätzliche Schädigung der Zellmembran. Zum Anderen wurde eine veränderte Aktivität von Kalzium-Kanälen beschrieben, die eine Kalzium-Überlastung in der Zelle verursacht [129]. Beide Wege enden in einer gestörten Kalzium-Homöostase, die über den Einfluss mechanosensitiver Kanäle bei Muskelaktivität noch verstärkt wird [130] und letztlich zur Apoptose oder Nekrose der Zelle führt [14]. Die Kalzium-Überlastung der Muskelfaser stellt dabei ein mögliches Target einer symptomatischen Therapie dar.

Wir wissen heute um eine Vielzahl an Auswirkungen dieses Zelluntergangs auf die Phy-

siologie des gesamten Skelettmuskels. Dieser bildet als Reaktion auf den Zelluntergang verstärkt neue Myozyten, was sich im histologischen Bild anhand einer Zunahme der Varianz der Faserkaliber und einer Zunahme von Zellkernen mit Lokalisation in der Mitte des Faserquerschnitts abbildet. Zudem lassen sich vermehrt fibrotische Areale als Ausdruck untergegangener Fasern nachweisen [116]. In unseren Untersuchungen zur Varianz der Faserkaliber ergaben sich nach statistischer Auswertung unter Verwendung des F-Tests signifikante Abweichungen in allen untersuchten Muskeln der *mdx*-Mutante. In der *trpv4^{-/-}*-Mutante ergab sich im Wesentlichen kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp. Unsere Ergebnisse der Untersuchungen zur Faserdegeneration (Fibrotische Areale) lieferten gleichartige Ergebnisse. Nach statistischer Auswertung mittels Rosenbaums „Quick test of Location“ ergaben sich signifikant erhöhte Werte für die *mdx*-Mutante, während sich in der *trpv4^{-/-}*-Mutante keine Unterschiede zum Wildtyp darstellten.

In den immunhistochemischen Experimenten zur Fasertypisierung ergaben sich (im statistisch nicht signifikanten Rahmen bei $n=4$) Hinweise auf den bekannten „Fasertypen-Shift“ bei vorrangiger Affektion von Fasern mit hoher Kontraktionsgeschwindigkeit [33]. Wesentliche Abweichungen in der Verteilung der Fasertypen fielen in der *trpv4^{-/-}*-Mutante nicht auf.

Die Resultate lieferten insgesamt erwartete Erkenntnisse im *mdx*-Mausmodell, während sich in Bezug auf die untersuchten Parameter Faserkaliber-Varianz, Ausprägung der Fibrose und Fasertypen-Zusammensetzung in der TRPV4-defizienten Maus (*trpv4^{-/-}*) nahezu keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit ihrem Wildtyp zeigten. Die untersuchten Parameter in der *trpv4^{-/-}*-Mutante näherten sich also nicht denen der *mdx*-Maus an, was darauf hindeuten könnte, dass eine verminderte Funktionalität des TRPV4-Proteins keine herausragende Rolle in der Krankheitsentstehung der DMD einnimmt. Dabei bleiben die Fragen weiter offen, ob die Funktionen von TRPV4 in der *trpv4^{-/-}*-Mutante durch Veränderung molekularer Prozesse durch andere Proteine kompensiert werden, ob der Kanal im *mdx*-Mausmodell überaktiv (*gain of function*) oder fehl-lokalisiert ist, oder ob der Kanal auch im Wildtyp keinen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung der Skelettmuskulatur leistet.

Bereits 2010 postulierte die Gruppe um Pratibha Verma mögliche Mechanismen der Expression und Regulation von TRPV4 anhand von Untersuchungen an transfizierten HEK-Zellen [131]. Inwieweit die Regulation der TRP-Kanäle *in vivo* diesen Mechanismen unterliegt, bleibt aktuell hypothetisch. Im Rahmen unserer Untersuchungen, insbesonde-

re auch in den umfangreichen Begleitexperimenten während der Erstellung und Testung der Färbeprotokolle, ließen sich in der intensiven Beobachtung der Präparate keine offensichtlichen Alterationen im Phänotyp der untersuchten Muskeln feststellen. Als mögliche Erklärung innerhalb dieser Diskussion ist also auch die Frage zu berücksichtigen, ob der Kanal *in vivo* in einem ständig inaktiven Zustand gehalten wird, um nur im Bedarfsfall rekrutiert zu werden. Diese Hypothese würde sehr gut erklären, warum unsere Ergebnisse für die *trpv4*^{-/-}-Mutante denen ihres Wildtyps ähnelten. Das zusätzliche Vorliegen einer Muskeldystrophie im Mausmodell könnte solch einen Bedarfsfall möglicherweise simulieren. Insofern wären weitergehende histologische und elektrophysiologische Untersuchungen an Doppelmutanten (Dystrophin- und TRPV4-defizient) inklusive vergleichender Untersuchungen mit den hier untersuchten Mutanten äußerst interessant, da hier eine Veränderung der Bedeutung von TRPV4 im Rahmen einer DMD-Erkrankung erörtert werden könnte.

Die Mechanismen, die die Zusammensetzung eines Muskels mit den unterschiedlichen Muskelfasern regulieren, sind heute Gegenstand intensiver Forschung [132]. Dabei sind die verschiedenen Qualitäten der äußeren Beanspruchung (Intensität der Kraftanstrengung, Dauer der Belastung, Dauer der Ruhephasen) für die zelluläre Antwortmatrix relevant. Diese berücksichtigt dann wiederum intrinsische Informationen (Genotyp, Alter, Geschlecht, Muskelaufbau, Hormonstatus, Ernährung, Immunstatus) für die Signaltransduktion zur Muskeladaptation [133].

Unsere Ergebnisse lassen insgesamt annehmen, dass eine mögliche spezifische Deaktivierung von TRPV4 (z.B. durch pharmakologische Hemmung) der Kanäle keinen wesentlichen Einfluss auf die eutrophe Entwicklung der untersuchten Skelettmuskeln ausübt. Die Konsequenzen einer Hemmung von TRPV4 unter Bedingungen einer gestörten Kalzium-Homöostase, dauerhafter Kraftbelastung, sowie eines höheren Lebensalters bedürfen weiterer Untersuchung.

Die verwendeten Mäuse aller Stämme waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen 100 Tage alt. Der Beginn histopathologischer Veränderungen von Skelettmuskulatur und Diaphragma in der *mdx*-Maus wird mit 3-4 Wochen angegeben [134], sodass diese in unseren Proben entsprechend nachweisbar waren. Für die *trpv4*^{-/-}-Mutante existieren aktuell noch keine Angaben für Symptome in der Skelett- und Atemmuskulatur in Abhängigkeit von ihrem Alter oder ihrer körperlichen Belastung. Die Überlegungen zu pathophysiologischen Mechanismen in der Entstehung neuromuskulärer Störungen lässt daher weitere Fragen aufkommen.

- 1.) Führt eine mechanische Belastung in der Skelettmuskulatur des TRPV4-defizienten Mausmodells zu struktureller Schädigung? Was könnte die molekulare Ursache einer Schädigung sein?
- 2.) Kommt es bei älteren Tieren zu spezifischen Symptomen als Ausdruck einer Störung der Skelettmuskelphysiologie?
- 3.) Ist die Kompensationsfähigkeit bei gestörter Kalzium-Homöostase (wie beispielsweise bei der DMD) in TRPV4-defizienten Tieren reduziert?

Die Gruppe um Hitoshi Yamashita nutzte 2012 Enzym-histochemische Methoden zum Nachweis von Typ-I-Muskelfasern im musculus soleus der *trpv4*^{-/-}-Maus. Sie fanden eine signifikante Zunahme dieser Fasern im Vergleich mit dem Wildtyp bei n=4 (p<0.05) [111]. In unserer Erweiterung dieser Untersuchungen mit immunhistochemischen Methoden konnte diese Zunahme der Typ-I-Fasern nicht gesehen werden. Yamashita und Kollegen untersuchten Mäuse im Alter von sieben Monaten, die unter vergleichbaren Bedingungen gehalten wurden, wie die von uns verwendeten. Der deutliche Altersunterschied der Mäuse (7 Monate gegen 100 Tage) lässt einen möglichen Beginn der Veränderung der Skelettmuskelphysiologie in der *trpv4*^{-/-}-Mutante zu einem späteren Zeitpunkt annehmen.

Entsprechende histologische und elektrophysiologische Untersuchungen an älteren Tieren und *mdx-trpv4*^{-/-}-Doppelmutanten sowie Verlaufsbeobachtungen könnten zur Aufklärung dieser Fragen beitragen.

Die Gruppe um Wolfgang Liedtke beschreibt in ihrer Publikation mit der Einführung der *trpv4*^{-/-}-Maus eine gestörte Fähigkeit der osmotischen Regulation in diesen Mäusen und zeigt, dass TRPV4 als osmotischer Sensor im zentralen Nervensystem (ZNS) arbeitet [119]. Grace und Kollegen stellten in ihrer Veröffentlichung aus dem September 2017 Erkrankungsbilder mit Möglichkeit der therapeutischen Regulation von TRPV4 heraus [103]. Aktuell befindet sich eine klinische Studie zur Behandlung des Lungenödems bei Rechtsherzinsuffizienz in der Phase 2 (NCT02119260). Verwendet wird hier der synthetische Hemmstoff GSK2798745 (GlaxoSmithKline, London, Großbritannien). Die Ergebnisse dieser Studie werden - auch in Hinblick auf unerwartete und unerwünschte Wirkungen - mit Spannung erwartet.

Zukünftige Möglichkeiten

Seit den 2000er Jahren rücken molekulare Therapien und die Gentherapie zur Behandlung der DMD zunehmend in den Fokus. Die Behandlung beruht auf dem Prinzip, genetisches Material für funktionelles Dystrophin in den Skelettmuskel einzubringen. Eine erste klinische Studie wurde 2010 von Mendell und Kollegen veröffentlicht [135]. Hier waren sechs Patienten mit einem entsprechenden Vektor behandelt worden. Im Verlauf konnte kein funktionelles Dystrophin in Muskelbiopsien nachgewiesen werden, die Kollegen schlussfolgerten aus einem gemessenen raschen Anstieg spezifischer T-Zellen eine Autoimmunreaktion. Neuere molekulare Behandlungsansätze beruhen auf dem Prinzip, die DNA über das Stopcodon hinaus ablesbar zu machen. Aktuell werden dabei zwei Wirkstoffe beschrieben.

Ataluren (PTC-124) kann in Patienten mit bestimmten Mutationen im Dystrophin-Gen (etwa 10-15% der Patienten) am Ribosom während des Translationsprozesses die Einfügung einer Aminosäure anstelle des Abbruchs der Translation vermitteln. Es entsteht eine geringe Menge verkürztes, aber funktionelles Dystrophin, das den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann [136, 137, 138, 139].

Eteplirsen ist ein Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligomer (PMO), das als Antisense-Oligonukleotid selektiv das Splicing an Exon 51 der prä-mRNA beeinflusst. Das Exon wird übersprungen oder entfernt (Exon-Skipping), sodass ein funktionelles Dystrophin entsteht [140]. Aktuell befinden sich mehrere Studien in der klinischen Phase, das Medikament erhielt in den USA bereits 2016 eine Zulassung im Schnellverfahren [141]. Die Zulassung in Europa wurde 2018 aufgrund mangelhaften Studiendesigns in der Zulassungsstudie vorläufig abgelehnt [142].

Außerdem wird mit BMS-986089 ein Stoff erforscht, der als Adnectin im Muskel an Myostatin bindet und dessen negative Effekte auf das Muskelwachstum inhibiert. Auf diese Weise konnten in Tierversuchen Muskelvolumenzunahmen erreicht werden. Der Ansatz befindet sich aktuell noch in der präklinischen Phase [143].

Auch die aktuellen - und vielversprechenden - Forschungsergebnisse aus dem Bereich der molekularen Therapien belegen derzeit nur eine Abmilderung der Symptomatik beziehungsweise eine Verlangsamung der Progredienz des Krankheitsverlaufs. Insofern ist auch die Fortsetzung der bestehenden umfangreichen Forschung an symptomatischen Behandlungsoptionen sinnvoll.

6 Zusammenfassung

Die Mechanismen, die zur Adaption quergestreifter Muskulatur an extrinsische und intrinsische Bedingungen führen, sind heute zu großen Teilen ungeklärt.

In Muskeldystrophien sind die Bedingungen für Muskelentwicklung, Wachstum und Adaption verändert, was den Muskel einer progredienten Degeneration unterwirft. Die Rolle der Familie der TRP-Ionenkanäle für diese Veränderung der Bedingungen ist hier Gegenstand der Forschung. Aktuell wird die Rolle der ubiquitär exprimierten Kanäle mit der Sensorik von Geschmack, Temperatur, Osmolarität, Nozizeption sowie taktiler Reize angegeben. Mit dem Nachweis der Mechanosensitivität des TRPV4-Kanals wurde dessen Bedeutung in Muskelfasern stärker erforscht.

In der vorliegenden Dissertation wurde in diesem Zusammenhang die Frage nach einer möglichen Rolle der Kanäle in der Pathophysiologie von Muskeldystrophien gestellt und demgemäß sowohl Beobachtungen am TRPV4-defizienten, als auch am Dystrophindefizienten Mausmodell durchgeführt. Dazu wurden Untersuchungen an repräsentativen Unterschenkelmuskeln (m. soleus, m. tibialis anterior, m. extensor digitorum longus) und dem Haupt-Atemmuskel (Zwerchfell) am *trpv4*^{-/-}-Mausmodell durchgeführt und mit dem korrespondierenden Wildtyp verglichen. Dieselben Analysen wurden gleichermaßen am allgemein akzeptierten Mausmodell für die Duchenne Muskeldystrophie umgesetzt und ebenfalls dem korrespondierenden Wildtyp gegenübergestellt. Die im dystrophen *mdx*-Modell typischen Veränderungen der Skelettmuskulatur (Dissemination der Faserkaliber, Bindegewebsvermehrung und Fasertypen-Shift) wurden erwartungsgemäß nachgewiesen. Es ergab sich eine signifikante Abweichung der Varianz der Faserkaliber in den HE-gefärbten Muskelquerschnitten. Diese Unterschiede konnten beim Vergleich der TRPV4-defizienten Mutante mit ihrem Wildtyp nicht nachgewiesen werden. Die in der DMD typische Zunahme von Bindegewebe im Muskelquerschnitt stellte sich in unseren Versuchen deutlich dar. Für alle vier untersuchten Muskeln zeigte sich nach Auswertung Sirius-Red-gefärbter Muskelquerschnitte ein etwa doppelt so großer Anteil an Bindegewebe wie im Wildtyp. Im Vergleich der TRPV4-defizienten Mutante mit ihrem Wildtyp ergab sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Bindegewebsanteil. Der in der DMD bekannte Untergang schnellerer Muskelfasern und die Neubildung langsamerer Fasern (Fasertypen-Shift) deutete sich in unseren Untersuchungen zur immunhistochemischen Fasertypisierung an. Bei geringer Größe der Stichprobe konnten jedoch kaum statistisch signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Im Vergleich der Fasertypisierung der TRPV4-defizienten Mutante mit ihrem korrespondierenden Wildtyp ergaben

sich nahezu keine Unterschiede.

Zusammengefasst ergaben sich in unseren histologischen Untersuchungen im Wesentlichen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Skelettmuskelkonstitution der $trpv4^{-/-}$ -Mutante und ihrem Wildtyp. So kann geschlussfolgert werden, dass die Abwesenheit des TRPV4-Kationenkanals keine Auswirkung auf das Wachstum und die Entwicklung der untersuchten quergestreiften Muskulatur hat und insbesondere nicht zu den bei der DMD typischen Veränderung der Muskelkonstitution führt.

Diese Ergebnisse lassen den generellen therapeutischen Einsatz von spezifischen TRPV4-Blockern mannigfaltiger Erkrankungen (beispielsweise des Rechtsherz-Insuffizienz-bedingten Lungenödems) noch verheißungsvoller erscheinen, da zunächst von unerwünschten Wirkungen in Bezug auf die Skelettmuskelkonstitution nicht ausgegangen werden muss. Im Falle eines noch zu erbringenden Nachweises einer bedeutsamen Rolle für die Pathophysiologie in Muskeldystrophien könnte eine spezifische Hemmung womöglich zur Verbesserung der Kalzium-Homöostase beitragen, ohne dass schwere Fehlentwicklungen befürchtet werden müssen.

7 Literaturverzeichnis

Literatur

- [1] Emery M. L. H. Emery, A. E. H. *The History of a genetic disease: Duchenne Muscular Dystrophy or Meryon's disease*. Royal Society of Medicine Press Limited, 1995.
- [2] Becker P. E. Pöch, H. Eine muskeldystrophie auf einem altägyptischen relief. *Nervenarzt*, page 26, 1955.
- [3] C. Bell. *The nervous system of the human body: embracing the papers delivered to the Royal Society on the subject of the nerves*. Washington: Stereotyped by D. Green, for the Register and Library of Medical and Chirurgical Science, 1833.
- [4] E. Meryon. Practical and pathological researches on the various forms of paralysis. 1864.
- [5] E. Meryon. On granular and fatty degeneration of the voluntary muscels. *Med Chir Trans*, pages 73–84, 1852.
- [6] G. B. A. Duchenne. Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclérosique. *Archives Générales de Médecine*, 1868.
- [7] W. R. Gowers. Pseudo-hypertrophic muscular paralysis: a clinical lecture. *Lancet*, 1879.
- [8] W. H. Erb. Dystrophia muscularis progressiva: Klinische und pathologisch-anatomische studien. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde 1*, pages 13–261, 1891.
- [9] Kiener F. Becker, P.E. Eine neue x-chromosomale muskeldystrophie. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten 193*, pages 27–48, 1955.
- [10] Pytel P. McNally, E. M. Muscle diseases: The muscular dystrophies. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, pages 87–109, 2007.
- [11] Amato A.A. Griggs, R.C., editor. *Handbook of Clinical Neurology: Muscular Dystrophies*, volume 101. Elsevier, 2011.

- [12] Brown Jr. R.H. Kunkel L.M. Hoffman, E.P. Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51(6):919–928, December 1987.
- [13] Zeiger U. Förderer M. Brinkmeier H. Fink R.H. Mosqueira, M. Cardiac and respiratory dysfunction in duchenne muscular dystrophy and the role of second messengers. *Med. Res. Rev.*, 33(5):1174–213, April 2013.
- [14] Sebille S. Cognard C. Constantin, B. New insights in the regulation of calcium transfers by muscle dystrophin-based cytoskeleton: implications in dmd. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 27(5-7):375–386, 2006.
- [15] A Teufel. *BASICS Humangenetik*. Elsevier URBAN & FISCHER, 2011.
- [16] Meyer S. Sitzmann F.C. Gortner, L. *Duale Reihe Pädiatrie*. Thieme, 2012.
- [17] M. Krzovska. *BASICS Neurologie*. Elsevier URBAN & FISCHER, 2009.
- [18] Negroni E. Cabello-Verrugio C. Mouly V. Trollet C. Cordova, G. Combined therapies for duchenne muscular dystrophy to optimize treatment efficacy. *Front Genet*, 9:114, 2018.
- [19] Valilou S.F. Bayat-H. Ebadi N. Daraei A. Yousefi M. Nesaei A. Mojarrad M. Salmaninejad, A. Duchenne muscular dystrophy: an updated review of common available therapies. *International Journal of Neuroscience*, 128(9):854–864, 2018.
- [20] Bisping F.-Krüger J. Brinkmeier H. Kunert-Keil, C. Tissue-specific expression of trp channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics*, 7:159, Jun 2006.
- [21] Reggiani C. Schiaffino, S. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 77(2):493–501, Aug 1994.
- [22] Karsch-Mizrachi I.-Campione M. Leinwand L. Schiaffino S. Smerdu, V. Type iix myosin heavy chain transcripts are expressed in type iib fibers of human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 267(6 Pt 1):C1723–1728, Dec 1994.
- [23] S. Schiaffino. Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol (Oxf)*, 199(4):451–463, Aug 2010.
- [24] Allen David L. Leinwand Leslie A. Harrison, Brooke C. Iib or not iib? regulation of myosin heavy chain gene expression in mice and men. *Skeletal Muscle*, 1(1):5, Feb 2011.

- [25] Staron R. S. Pette, D. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem. Cell Biol.*, 115(5):359–372, May 2001.
- [26] Quadrilatero J. Bloemberg, D. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *PLoS ONE*, 7(4):e35273, 2012.
- [27] Peuker H.S. Staron R. Pette, D. The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. 166:261–77, 09 1999.
- [28] Reggiani C. Schiaffino, S. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.*, 91(4):1447–1531, Oct 2011.
- [29] R. Eckert. *Tierphysiologie*, volume 3. Thieme, 2000.
- [30] Stevens J. Binder-Macleod S. A. Scott, W. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther*, 81(11):1810–1816, Nov 2001.
- [31] Bhaskaran S. Van Remmen H. Qaisar, R. Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radic. Biol. Med.*, 98:56–67, 09 2016.
- [32] Williams P. E. Goldspink G. Marshall, P. A. Accumulation of collagen and altered fiber-type ratios as indicators of abnormal muscle gene expression in the mdx dystrophic mouse. *Muscle Nerve*, 12(7):528–537, Jul 1989.
- [33] Silberstein L. Hays A.P. Blau H.M. Webster, C. Fast muscle fibers are preferentially affected in duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 52:503–513, Feb 1988.
- [34] Manning A. Cosens, D. J. Abnormal electroretinogram from a drosophila mutant. *Nature*, 224(5216):285–287, Oct 1969.
- [35] Rubin G. M. Montell, C. Molecular characterization of the drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4):1313–1323, Apr 1989.
- [36] R. C. Hardie. A brief history of trp: commentary and personal perspective. *Pflugers Arch.*, 461(5):493–498, May 2011.
- [37] C. Montell. The trp superfamily of cation channels. *Sci. STKE*, 2005(272):re3, Feb 2005.

- [38] Julius D. Montell C. Schultz G. Clapham, D. E. International union of pharmacology. xlix. nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol. Rev.*, 57(4):427–450, Dec 2005.
- [39] Montell C. Venkatachalam, K. Trp channels. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1):387–417, 2007.
- [40] Mojet M. H. Chyb S. Hardie R. C. Reuss, H. In vivo analysis of the drosophila light-sensitive channels, trp and trpl. *Neuron*, 19(6):1249–1259, Dec 1997.
- [41] Harris G. L. Stevens C. F. Zuker C. S. Ranganathan, R. A drosophila mutant defective in extracellular calcium-dependent photoreceptor deactivation and rapid desensitization. *Nature*, 354(6350):230–232, Nov 1991.
- [42] Tamara Luti Rosenbaum Emir., editor. *Neurobiology of TRP Channels, 2nd edition*. Frontiers in Neuroscience. CRC Press, 2017.
- [43] Dina O. A. Joseph E. K. Reichling D. B. Levine J. D. Alessandri-Haber, N. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and src tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *J. Neurosci.*, 28(5):1046–1057, Jan 2008.
- [44] Pape H.-C. Kurtz A. Silbernagl S. Klinke, R., editor. *Physiologie*, volume 6. Auflage. Thieme, 2012.
- [45] Jardin-I. Rosado J. A. Salido, G. M. The trpc ion channels: association with orai1 and stim1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 704:413–433, 2011.
- [46] Frieden-M. Demaurex N. Shen, W. W. Remodelling of the endoplasmic reticulum during store-operated calcium entry. *Biol. Cell*, 103(8):365–380, Aug 2011.
- [47] H. Brinkmeier. Trp channels in skeletal muscle: gene expression, function and implications for disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 704:749–758, 2011.
- [48] Talavera K.-Owsianik G. Prenen J. Droogmans G. Voets T. Nilius, B. Gating of trp channels: a voltage connection? *J. Physiol. (Lond.)*, 567(Pt 1):35–44, Aug 2005.
- [49] Yuan-J. X. Song, M. Y. Introduction to trp channels: structure, function, and regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 661:99–108, 2010.

- [50] Chu-W. F. Song B. Gooz M. Zhang J. N. Yu C. J. Jiang S. Baldys A. Gooz P. Steele S. Owsianik G. Nilius B. Komlosi P. Bell P. D. Zhang, Z. R. Trpp2 and trpv4 form an egf-activated calcium permeable channel at the apical membrane of renal collecting duct cells. *PLoS ONE*, 8(8):e73424, 2013.
- [51] Choe Y.-Marti-Renom M. A. Bell A. M. Denis C. S. Sali A. Hudspeth A. J. Friedman J. M. Heller S. Liedtke, W. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (vr-oac), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, 103(3):525–535, Oct 2000.
- [52] Harteneck C.-Nunnenmacher-K. Schultz G. Plant T. D. Strotmann, R. Otrpc4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat. Cell Biol.*, 2(10):695–702, Oct 2000.
- [53] Hurle-M.-Facer P. Alnadaf T. Plumpton C. Kinghorn I. See C. G. Costigan M. Anand P. Woolf C. J. Crowther D. Sanseau P. Tate S. N. Delany, N. S. Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, vrl-2. *Physiol. Genomics*, 4(3):165–174, Jan 2001.
- [54] Kim C. Liedtke, W. Functionality of the trpv subfamily of trp ion channels: add mechano-trp and osmo-trp to the lexicon! *Cell. Mol. Life Sci.*, 62(24):2985–3001, Dec 2005.
- [55] Murakami M.-Ohba-T. Takahashi Y. Ito H. Watanabe, H. Trp channel and cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.*, 118(3):337–351, Jun 2008.
- [56] W. Liedtke. Trpv4 as osmosensor: a transgenic approach. *Pflugers Arch.*, 451(1):176–180, Oct 2005.
- [57] Watanabe Y.-Oyama-Y. Mizuno A. Kusano E. Hirao A. Ookawara S. Suzuki, M. Localization of mechanosensitive channel trpv4 in mouse skin. *Neurosci. Lett.*, 353(3):189–192, Dec 2003.
- [58] B. Nilius. Trp channels in disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1772(8):805–812, Aug 2007.
- [59] Benham-C. D. Randall A. Davis J. B. Gunthorpe, M. J. The diversity in the vanilloid (trpv) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.*, 23(4):183–191, Apr 2002.

- [60] Zhen X.-Ghosh D. Vriens J. Gevaert T. Gilbert J. P. Hayward N. J. McNamara C. R. Xue F. Moran M. M. Strassmaier T. Uykai E. Owsianik G. Vennekens R. De Ridder D. Nilius B. Fanger C. M. Voets T. Everaerts, W. Inhibition of the cation channel *trpv4* improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(44):19084–19089, Nov 2010.
- [61] Bonev-A. D. Ledoux J. Liedtke W. Kotlikoff M. I. Heppner T. J. Hill-Eubanks D. C. Nelson M. T. Sonkusare, S. K. Elementary ca^{2+} signals through endothelial *trpv4* channels regulate vascular function. *Science*, 336(6081):597–601, May 2012.
- [62] Kleiner S.-Wu J. Sah R. Gupta R.K. Banks A.S. Cohen P. Khandekar M.J. Boström-P. Mepani R.J. Laznik D. Kamenecka T.M. Song X. Liedtke W. Mootha V.K. Puigserver P. Griffin P.R. Clapham D.E. Spiegelman B.M. Ye, L. *Trpv4* is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. *Cell*, 151(1):96–110, Sep 2012.
- [63] Ma J.-Zhang P. Zheng J. Hu, L. Extracellular hypotonicity induces disturbance of sodium currents in rat ventricular myocytes. *Physiol Res*, 58(6):807–815, 2009.
- [64] Pauyo T.-Drapp R. Tavares M. J. Liedtke W. Brayden J. E. Earley, S. *Trpv4*-dependent dilation of peripheral resistance arteries influences arterial pressure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 297(3):H1096–1102, Sep 2009.
- [65] Lange-T. Kasch J. Kunert-Keil C. Liedtke W. Brinkmeier H. Pritschow, B. W. Functional *trpv4* channels are expressed in mouse skeletal muscle and can modulate resting ca^{2+} influx and muscle fatigue. *Pflügers Arch.*, 461(1):115–122, Jan 2011.
- [66] Akanni W.-Amode M. R. Barrell-D. Billis K. Carvalho-Silva D. Cummins C. Clapham-P. Fitzgerald S. Gil L. Giron C. G. Gordon L. Hourlier T. Hunt S. E. Janacek S. H. Johnson N. Juettemann T. Keenan S. Lavidas I. Martin F. J. Maurel T. McLaren W. Murphy D. N. Nag R. Nuhn M. Parker A. Patricio M. Pignatelli M. Rahtz M. Riat H. S. Sheppard D. Taylor K. Thormann A. Vullo A. Wilder S. P. Zadissa A. Birney E. Harrow J. Muffato M. Perry E. Ruffier M. Spudich G. Trevanion S. J. Cunningham F. Aken B. L. Zerbino D. R. Flicek P. Yates, A. Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res.*, 44(D1):D710–716, Jan 2016.
- [67] Watanabe H.-Vriens J. Nilius, B. The *trpv4* channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour. *Pflügers Arch.*, 446(3):298–303, Jun 2003.

- [68] Strotmann R. Plant T.D. *Transient Receptor Potential (TRP) Channels. Handbook of Experimental Pharmacology*, volume 179. Springer, 2007.
- [69] Montalban-Arques A. Liarte S.-de Oliveira S. Pardo-Pastor C. Rubio-Moscardo F.-Meseguer J. Valverde M. A. Mulero V. Galindo-Villegas, J. Trpv4-mediated detection of hyposmotic stress by skin keratinocytes activates developmental immunity. *J. Immunol.*, 196(2):738–749, Jan 2016.
- [70] Olschewski-A. Papic L. Kremer-H. McEntagart M. E.-Uhrig S. Fischer-C. Frohlich-E. Balint Z. Tang B. Strohmaier H. Lochmuller H. Schlotter-Weigel B. Senderek J. Krebs A. Dick K. J. Petty R. Longman C. Anderson N. E. Padberg G. W. Schelhaas H. J. van Ravenswaaij-Arts C. M. Pieber T. R. Crosby A. H. Guelly C. Auer-Grumbach, M. Alterations in the ankyrin domain of trpv4 cause congenital distal sma, scapuloperoneal sma and hmsn2c. *Nat. Genet.*, 42(2):160–164, Feb 2010.
- [71] Hirnet D.-Wissenbach U. Flockerzi V.-Niemeyer B. A. Erler, I. Ca²⁺-selective transient receptor potential v channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J. Biol. Chem.*, 279(33):34456–34463, Aug 2004.
- [72] Nilius B.-Owsianik G. Everaerts, W. The vanilloid transient receptor potential channel trpv4: from structure to disease. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 103(1):2–17, Sep 2010.
- [73] Semtner M.-Kepura F. Plant T. D. Schoneberg T. Strotmann, R. Interdomain interactions control ca²⁺-dependent potentiation in the cation channel trpv4. *PLoS ONE*, 5(5):e10580, May 2010.
- [74] Davis J. B. Smart D. Jerman J. C. Smith G. D. Hayes P.-Vriens J.-Cairns W. Wissenbach U. Prenen J. Flockerzi V. Droogmans G.-Benham C. D. Nilius B. Watanabe, H. Activation of trpv4 channels (hvrl-2/mtrp12) by phorbol derivatives. *J. Biol. Chem.*, 277(16):13569–13577, Apr 2002.
- [75] Vriens J. Prenen J. Droogmans G. Voets T. Nilius B. Watanabe, H. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate trpv4 channels. *Nature*, 424(6947):434–438, Jul 2003.
- [76] Maloney K. N. Pothen R. G. Clardy J. Clapham D. E. Smith, P. L. Bisandrographolide from andrographis paniculata activates trpv4 channels. *J. Biol. Chem.*, 281(40):29897–29904, Oct 2006.

- [77] Acevedo A. Nguyen M. T. Dourado M. DeFalco J. Gustafson A. Spiro P.-Emerling D. E. Kelly M. G. Duncton M. A. Vincent, F. Identification and characterization of novel trpv4 modulators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 389(3):490–494, Nov 2009.
- [78] Bao W. Nerurkar S. Yue T. L. Doe C. P. Stankus G.-Turner G. H. Ju H. Thomas H. Fishman C. E. Sulpizio A.-Behm D. J. Hoffman S. Lin Z. Lozinskaya I. Casillas L. N. Lin M. Trout R. E. Votta B. J. Thorneloe K. Lashinger E. S. Figueroa D. J. Marquis R. Xu X. Willette, R. N. Systemic activation of the transient receptor potential vanilloid subtype 4 channel causes endothelial failure and circulatory collapse: Part 2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 326(2):443–452, Aug 2008.
- [79] Appendino G. Nilius B. Vriens, J. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol. Pharmacol.*, 75(6):1262–1279, Jun 2009.
- [80] M. T. Acevedo A. Zipfel S. Defalco J. Dourado M. Gustafson-A. E. Steiger D. Chi C. Yip V. Zhang Q. Victoria C. L. Reubish D. S. Spiro P. A. Kelly M. G. Kincaid J. Emerling D. E. Duncton M. Vincent F. Wei, Z.-L. N. In discovery of a proof-of-concept trpv4 antagonist. Technical report, Keystone Symposia on the Transient Receptor Potential Ion Channel Superfamily, Breckenridge, Colorado, USA, 2007.
- [81] Vriens J. Martyn D. Clardy J. Clapham D. E. Stotz, S. C. Citral sensing by transient [corrected] receptor potential channels in dorsal root ganglion neurons. *PLoS ONE*, 3(5):e2082, May 2008.
- [82] Leddy H. A. Votta B. J. Kumar S. Levy D. S. Lipshutz-D. B. Lee S. H. Liedtke W. Guilak F. Phan, M. N. Functional characterization of trpv4 as an osmotically sensitive ion channel in porcine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.*, 60(10):3028–3037, Oct 2009.
- [83] Wang R. R. Choo S. S. Gaudet R. Phelps, C. B. Differential regulation of trpv1, trpv3, and trpv4 sensitivity through a conserved binding site on the ankyrin repeat domain. *J. Biol. Chem.*, 285(1):731–740, Jan 2010.
- [84] Yeh J. J. Boyd A. E. Parada C. A. Chen X. Reichling-D. B. Levine J. D. Alessandri-Haber, N. Hypotonicity induces trpv4-mediated nociception in rat. *Neuron*, 39(3):497–511, Jul 2003.

- [85] Heyken W. T. Kacik M. Kaistha A. Grgic I. Harteneck C. Liedtke W.-Hoyer J. Kohler R. Hartmannsgruber, V. Arterial response to shear stress critically depends on endothelial trpv4 expression. *PLoS ONE*, 2(9):e827, Sep 2007.
- [86] Troidl K. Schierling W. Cai W. J. Nef H. Mollmann H. Kostin S.-Schimanski S. Hammer L. Elsasser A. Schmitz-Rixen T. Schaper W. Troidl, C. Trpv4 induces collateral vessel growth during regeneration of the arterial circulation. *J. Cell. Mol. Med.*, 13(8B):2613–2621, Aug 2009.
- [87] Wang L. Ranke H. Liedtke W. Tabuchi A. Kuebler W. M. Goldenberg, N. M. Trpv4 is required for hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Anesthesiology*, 122(6):1338–1348, Jun 2015.
- [88] Mizuno A. Hayata T. Nakashima K. Heller S. Ushida T. Sokabe M. Miyasaka-N. Suzuki M. Ezura Y. Noda M. Mizoguchi, F. Transient receptor potential vanilloid 4 deficiency suppresses unloading-induced bone loss. *J. Cell. Physiol.*, 216(1):47–53, Jul 2008.
- [89] Sulpizio A.C. Lin Z. Figueroa D.J. Clouse A.K. McCafferty G.P. Chendrimada T.P. Lashinger-E.S. Gordon E. Evans L. Misajet B.A.-Demarini D.J. Nation J.H. Casillas L.N. Marquis R.W. Votta B.J. Sheardown S.A. Xu X. Brooks D.P. Laping N.J. Westfall T.D. Thorneloe, KS. N-((1s)-1-[4-((2S)-2-[(2,4-dichlorophenyl)sulfonyl]amino-3-hydroxypropanoyl)-1-piperazinyl]carbonyl-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (gsk1016790a), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part i. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 326(2):432–442, Aug 2008.
- [90] Tiffany C. Ho, Natalie A. Horn, Tuan Huynh, Lucy Kelava, and Jeffrey B. Lansman. Evidence trpv4 contributes to mechanosensitive ion channels in mouse skeletal muscle fibers. *Channels*, 6(4):246–254, 2012. PMID: 22785252.
- [91] Pyle A Evangelista T, Bansagi B. Phenotypic variability of trpv4 related neuropathies. *Neuromuscul Disord.*, 25(6):516–521, 2015.
- [92] Chris Dupont, Kevin Novak, Kirsten Denman, Jessica H. Myers, Jeremy M. Sullivan, Phillip V. Walker II, Nicklaus L. Brown, David R. Ladle, Laurent Bogdanik, Cathleen M. Lutz, Andrew A. Voss, Charlotte J. Sumner, and Mark M. Rich.

- Trpv4 antagonism prevents mechanically induced myotonia. *Annals of Neurology*, 88(2):297–308, 2020.
- [93] Sumner C. E Hoover-Fong J.E. Schindler, A. Trpv4-associated disorders. Internet, May 2014.
- [94] Prenen J. Funari-V. A. Funari T. L. Merriman B. Nelson S. F. Lachman R. S. Wilcox W. R.-Reyno S. Quadrelli R. Vaglio A. Owsianik G. Janssens A. Voets T. Ikegawa S. Nagai T. Rimoin D. L. Nilius B. Cohn D. H. Rock, M. J. Gain-of-function mutations in trpv4 cause autosomal dominant brachyolmia. *Nat. Genet.*, 40(8):999–1003, Aug 2008.
- [95] B. Leiber. *Die klinischen Syndrome - Syndrome,Sequenzen und Symptomenkomplexe*. Urban und Schwarzenberg, 1996.
- [96] Yuan Y. Gresshoff-I. L. Rowley L. Belluoccio D. Kaluarachchi K. Little C. B. Botzenhart E. Zerres K. Amor-D. J. Cole W. G. Savarirayan R. McIntyre P. Bateman J. F. Lamande, S. R. Mutations in trpv4 cause an inherited arthropathy of hands and feet. *Nat. Genet.*, 43(11):1142–1146, Oct 2011.
- [97] Vriens J. Camacho N.-Luong P. Deixler H. Funari T. L. Bacino C. A. Irons M. B. Holm I. A.-Sadler L. Okenfuss E. B. Janssens A. Voets T. Rimoin D. L. Lachman R. S. Nilius B. Cohn D. H. Krakow, D. Mutations in the gene encoding the calcium-permeable ion channel trpv4 produce spondylometaphyseal dysplasia, kozlowski type and metatropic dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.*, 84(3):307–315, Mar 2009.
- [98] Lausch E. Savarirayan R.-Shiba M. Spranger J. Zabel B. Ikegawa S. Superti-Furga A. Unger S. Nishimura, G. Trpv4-associated skeletal dysplasias. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 160C(3):190–204, Aug 2012.
- [99] Krakow D. Johnykutty S.-Katzman P. J. Pepkowitz S. Vriens J. Nilius B.-Boyce B. F. Cohn D. H. Camacho, N. Dominant trpv4 mutations in nonlethal and lethal metatropic dysplasia. *Am. J. Med. Genet. A*, 152A(5):1169–1177, May 2010.
- [100] Zdebik A. A. Martinez-T. L. Burnett B. G. Stanescu H. C. Inada-H. Shi Y. Taye A. A. Kong-L. Munns C. H. Choo S. S. Phelps C. B. Paudel R. Houlden H. Ludlow C. L. Caterina M. J. Gaudet R. Kleta R. Fischbeck K. H. Sumner C. J. Landouere, G. Mutations in trpv4 cause charcot-marie-tooth disease type 2c. *Nat. Genet.*, 42(2):170–174, Feb 2010.

- [101] Grove L. M.-Paruchuri S. Southern B. D. Abraham S. Niese K. A. Scheraga R. G. Ghosh S. Thodeti-C. K. Zhang D. X. Moran M. M. Schilling W. P. Tschumperlin D. J. Olman M. A. Rahaman, S. O. Trpv4 mediates myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.*, 124(12):5225–5238, Dec 2014.
- [102] Eltom S. Dekkak B.-Yew-Booth L. Dubuis E. D. Maher S. A. Belvisi M. G. Birrell M. A. Baxter, M. Role of transient receptor potential and pannexin channels in cigarette smoke-triggered atp release in the lung. *Thorax*, 69(12):1080–1089, Dec 2014.
- [103] Bonvini S. J.-Belvisi-M. G. McIntyre P. Grace, M. S. Modulation of the trpv4 ion channel as a therapeutic target for disease. *Pharmacol. Ther.*, 177:9–22, Sep 2017.
- [104] Woodworth B. A. Xiong-G.-Wolfe S. G. Antunes M. B. Cohen N. A. Bhargave, G. Transient receptor potential vanilloid type 4 channel expression in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol*, 22(1):7–12, 2008.
- [105] Mamenko M. Berrout J.-Boukelmoune-N. O’Neil R. G. Pochynyuk O. Zaika, O. Trpv4 dysfunction promotes renal cystogenesis in autosomal recessive polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 24(4):604–616, Mar 2013.
- [106] Hoenderop J. G.-Bindels-R. J. Hsu, Y. J. Trp channels in kidney disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1772(8):928–936, Aug 2007.
- [107] Fu Y. Garcia-Elias-A.-Fernandez-Fernandez J. M. Vicente R. Kramer P. L. Klein R. F. Hitzemann R. Orwoll-E. S. Wilmot B. McWeeney S. Valverde M. A. Cohen D. M. Tian, W. A loss-of-function nonsynonymous polymorphism in the osmoregulatory trpv4 gene is associated with human hyponatremia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(33):14034–14039, Aug 2009.
- [108] Vriens J. Segal-A.-Everaerts-W.-Roskams T. Talavera K. Owsianik G. Liedtke W. Daelemans D. Dewachter I. Van Leuven-F. Voets T. De Ridder D. Nilius B. Gevaert, T. Deletion of the transient receptor potential cation channel trpv4 impairs murine bladder voiding. *J. Clin. Invest.*, 117(11):3453–3462, Nov 2007.
- [109] Suzuki M. Mizuno-A.-Hara-A. Tabuchi, K. Hearing impairment in trpv4 knockout mice. *Neurosci. Lett.*, 382(3):304–308, Jul 2005.

- [110] Taniguchi J. Satoh-J.-Mizuno-A.-Suzuki M. Todaka, H. Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (trpv4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *J. Biol. Chem.*, 279(34):35133–35138, Aug 2004.
- [111] Wang Z. Mizuno-A.-Suzuki-M.-Yamashita H. Kusudo, T. Trpv4 deficiency increases skeletal muscle metabolic capacity and resistance against diet-induced obesity. *J. Appl. Physiol.*, 112(7):1223–1232, Apr 2012.
- [112] Voets T. Nilius, B. The puzzle of trpv4 channelopathies. *EMBO Rep.*, 14(2):152–163, Feb 2013.
- [113] Kunert-Keil C.-Bisping-F.-Brinkmeier-H. Krüger, J. Transient receptor potential cation channels in normal and dystrophic mdx muscle. *Neuromuscul. Disord.*, 18(6):501–513, Jun 2008.
- [114] Geng-Y. Ryder-Cook-A. S.-Barnard E. A. Darlison M. G. Barnard P. J. Sicinski, P. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*, 244(4912):1578–1580, Jun 1989.
- [115] Campbell-K.P. Ohlendieck, K. Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. *Cell Biology International*, 115(6):1685–94, 1991.
- [116] Shotton-D.M. Carnwath, J.W. Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *Journal of the Neurological Sciences*, 80(1):39–54, 1987.
- [117] Edwards-R.H. Jackson M.J. McArdle, A. Time course of changes in plasma membrane permeability in the dystrophin-deficient mdx mouse. *Muscle & Nerve*, 17(12):1378–84, 1994.
- [118] G Bulfield, W G Siller, P A Wight, and K J Moore. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(4):1189–1192, 1984.
- [119] Friedman-J. M. Liedtke, W. Abnormal osmotic regulation in trpv4^{-/-} mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23):13698–13703, 2003.
- [120] R. C. Nairn A. Maxwell, H. A. Ward. Freezing in an isopentane-liquid nitrogen mixture and storage in 2-octanol: Technical improvements for immunofluorescence. *Stain Technology*, 41(6):305–307, 1966.

- [121] M. Donovan. *Cryotechniques for light microscopy. In: Laboratory histopathology: a complete reference.* Number Ch. 4.5. Churchill Livingstone, 1996.
- [122] R. Lüllmann-Rauch. *Histologie.* Number S. 600-601. Thieme, 2009.
- [123] Courdier-Fruh I. Foster M. Meier-T. Magyar J. P. Briguet, A. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. *Neuromuscul. Disord.*, 14(10):675–682, Oct 2004.
- [124] Junqueira L. C. Brentani R. R. Junquiera, L. C. A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Anal. Biochem.*, 94(1):96–99, Apr 1979.
- [125] Statistics Kingdom. F-test calculator [internet]. <http://www.statskingdom.com>, November 2017. Abgerufen am 02.03.2021.
- [126] S. Rosenbaum. Tables for a nonparametric test of location. *The Annals of Mathematical Statistics*, 25(1):146 – 150, 1954.
- [127] Bahram Mokri and Andrew G. Engel. Duchenne dystrophy: Electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology*, 51(1):1–1–a, 1998.
- [128] A. E. H. Emery. Carrier detection in sex-linked muscular dystrophy. *J Genet Hum*, 14(4):318–29, 1965.
- [129] MJ Jackson, DA Jones, and RH Edwards. Measurements of calcium and other elements in muscle biopsy samples from patients with duchenne muscular dystrophy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 147(3):215—221, April 1985.
- [130] B J Petrof, J B Shrager, H H Stedman, A M Kelly, and H L Sweeney. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(8):3710–3714, 1993.
- [131] Pratibha Verma, Ashutosh Kumar, and Chandan Goswami. Trpv4-mediated channelopathies. *Channels*, 4(4):319–328, 2010. PMID: 20676052.
- [132] P. Platen. Höher - weiter - schneller. ausdauertraining, krafttraining und effekte von hypoxie: molekulare mechanismen und individuelle trainingsvariablen. *Sportverletzung Sportschaden*, 30(3):139–142, 2016.

- [133] Boutellier U. Toigo, M. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. *Eur J Appl Physiol*, 97:643–663, 2006.
- [134] Chang A.C. Day J.W. et al. Yucel, N. Humanizing the mdx mouse model of dmd: the long and the short of it. *npj Regen Med*, 3(4), 2018.
- [135] Jerry R. Mendell, Katherine Campbell, Louise Rodino-Klapac, Zarife Sahenk, Chris Shilling, Sarah Lewis, Dawn Bowles, Steven Gray, Chengwen Li, Gloria Galloway, Vinod Malik, Brian Coley, K. Reed Clark, Juan Li, Xiao Xiao, Jade Samulski, Scott W. McPhee, R. Jude Samulski, and Christopher M. Walker. Dystrophin immunity in duchenne’s muscular dystrophy. *New England Journal of Medicine*, 363(15):1429–1437, 2010. PMID: 20925545.
- [136] Katharine Bushby, Richard Finkel, Brenda Wong, Richard Barohn, Craig Campbell, Giacomo P. Comi, Anne M. Connolly, John W. Day, Kevin M. Flanigan, Nathalie Goemans, Kristi J. Jones, Eugenio Mercuri, Ros Quinlivan, James B. Renfroe, Barry Russman, Monique M. Ryan, Mar Tulinius, Thomas Voit, Steven A. Moore, H. Lee Sweeney, Richard T. Abresch, Kim L. Coleman, Michelle Eagle, Julaine Florence, Eduard Gappmaier, Allan M. Glanzman, Erik Henricson, Jay Barth, Gary L. Elfring, Allen Reha, Robert J. Spiegel, Michael W. O’donnell, Stuart W. Peltz, Craig M. McDonald, and FOR THE PTC124-GD-007-DMD STUDY GROUP. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle & Nerve*, 50(4):477–487, 2014.
- [137] Manuel et al. Haas. European medicines agency review of ataluren for the treatment of ambulant patients aged 5 years and older with duchenne muscular dystrophy resulting from a nonsense mutation in the dystrophin gene. *Neuromuscular Disorders*, 25(1):5–13, 2015.
- [138] Luca Bello, Lauren P. Morgenroth, Heather Gordish-Dressman, Eric P. Hoffman, Craig M. McDonald, and Sebahattin Cirak. Dmd genotypes and loss of ambulation in the cinrg duchenne natural history study. *Neurology*, 87(4):401–409, 2016.
- [139] Nagaraju K et al. Rosenberg AS, Puig M. Immune-mediated pathology in duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med.*, 7(299), 2015.
- [140] Feng L Arechavala-Gomez V Guglieri M Straub V Bushby K Cirak S Morgan J Muntoni F Anthony, K. Exon skipping quantification by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction in duchenne muscular dystrophy patients

- treated with the antisense oligomer eteplirsen. *Human Gene Therapy Methods*, 23(5):336–345, 2012.
- [141] A Mende. Zulassung für mittel gegen duchenne-dystrophie. *Pharmazeutische Zeitung*, 39, 2016.
- [142] European Medicines Agency, 30 Churchill Place, Canary Wharf, London E14 5EU, United Kingdom. *Refusal of the marketing authorisation for Exondys (eteplirsen)*, September 2018.
- [143] M. et al. Madireddi. Bms-986089 is a high affinity anti-myostatin adnectin that increases muscle volume in three preclinical species. *Neuromuscular Disorders*, 26:94&95, 2016.

8 Abkürzungsverzeichnis

4 α PDD	4-Alpha-Phorbol-12,13-Didecanoat
5,6-EET	5,6-Epoxyeicosatriensäure
ANK	Ankyrinwiederholungsdomäne
BSA	Bovines Serumalbumin
CDSMA	Kongenitale distale spinale Muskelatrophie
CMT2C	Charcot-Marie-Tooth-Krankheit vom Typ 2C
DMD	Duchenne Muskeldystrophie
ECM	Extrazelluläre Matrix
HEK-Zellen	Human embryonic kidney-Zellen
MHC	myosin heavy chain
NOMPC	no mechanoreceptor potential C
OTRPC4	OSM9-like transient receptor potential channel, member 4
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PMO	Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligomer
SPSMA	Scapulooperoneale spinale Muskelatrophie
SD	Standard Deviation
TRP	Transient receptor potential cation channel
TRPV4	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4
VR-OAC	vanilloid-receptor related osmotically activated channel
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Anhang

9.1 Ergebnisse Faserkaliber

Angegeben wird die prozentuale Verteilung der Fasern über die verschiedenen Feret-Durchmesser, die in Mikrometer (μm) angegeben sind, sowie die Standardabweichung (SD).

	Minimaler Feret-Durchmesser in μm									
	<10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	90-100
trpv4 ^{-/-}	0	0,5	7,951	38,265	34,333	16,451	2,5	0	0	0
SD	0	1	5,14	11,457	10	6,47	3	0	0	0
BL/6J	0	0	22,902	49,696	23,932	3,471	0	0	0	0
SD	0	0	15,732	7,571	16,548	1,864	0	0	0	0
<i>mdx</i>	0	3,5	23,592	35,745	22,551	13,112	1	0,5	0	0
SD	0	2,517	15,221	11,139	12,101	10,65	2	1	0	0
BL/10	0	0,5	18,843	49,304	26,853	3,5	0,5	0,5	0	0
SD	0	1	11,8321	7,536	9,251	3	1	1	0	0

Tabelle 4: Ergebnisse Faserkaliber im musculus soleus

	Minimaler Feret-Durchmesser in μm									
	<10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	90-100
trpv4 ^{-/-}	0,5	0,5	14,382	25,882	32,853	18,412	5,99	1,481	0	0
SD	1	1	7,17	9,696	6,104	6,619	4,63	1,881	0	0
BL/6J	0	0,5	14,582	28,163	26,592	19,123	8,531	2,01	0,5	0
SD	0	1	7,573	4,529	8,58	7,143	5,241	2,826	1	0
<i>mdx</i>	0	4,031	11,092	17,602	26,633	17,072	13,561	7,01	2	1
SD	0	2,858	5,923	5,573	5,25	4,703	4,409	4,147	1,633	1,155
BL/10	0	1,01	15,611	39,674	22,143	15,612	4,5	1	0,5	0
SD	0	1,167	6,929	5,024	9,645	7,681	7,724	2	1	0

Tabelle 5: Ergebnisse Faserkaliber im musculus tibialis anterior

	Minimaler Feret-Durchmesser in μm									
	<10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	90-100
trpv4 ^{-/-}	0	8,981	26,382	29,432	27,275	6,951	0,49	0,49	0	0
SD	0	5,796	3,137	10,639	12,359	3,408	0,981	0,981	0	0
BL/6J	0	4,99	31,275	31,324	18,932	12,481	1	0	0	0
SD	0	5,299	12,877	7,938	11,057	12,811	1,155	0	0	0
<i>mdx</i>	0	9,471	20,932	27,873	27,333	10,941	3,451	0	0	0
SD	0	3,456	12,11	5,236	7,717	3,443	4,339	0	0	0
BL/10	0	9,941	31,304	30,343	24,422	3,49	0,5	0	0	0
SD	0	3,962	6,687	7,151	9,668	3,421	1	0	0	0

Tabelle 6: Ergebnisse Faserkaliber im musculus extensor digitorum longus

	Minimaler Feret-Durchmesser in μm									
	<10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	90-100
trpv4 ^{-/-}	0,5	26,882	47,765	22,863	1	0,99	0	0	0	0
SD	1	11,533	9,944	2,282	1,155	1,144	0	0	0	0
BL/6J	0,5	22,461	58,716	15,373	2,951	0	0	0	0	0
SD	1	16,407	14,321	8,01	4,665	0	0	0	0	0
<i>mdx</i>	2	31,343	43,784	19,882	2,99	0	0	0	0	0
SD	1,633	8,38	4,342	3,483	2,587	0	0	0	0	0
BL/10	0	30,892	54,226	13,892	0,99	0	0	0	0	0
SD	0	10,644	9,103	6,564	1,144	0	0	0	0	0

Tabelle 7: Ergebnisse Faserkaliber im Diaphragma

9.2 Ergebnisse Kollagengehalt

Angegeben wird der Kollagengehalt in Prozent (%) und die Standardabweichung (SD).

	Kollagengehalt in %	SD
trpv4 ^{-/-}	5,64	1,856121
BL/6J	5,48	1,020444
<i>mdx</i>	10,62	2,474574
BL/10	5,16	1,582108

Tabelle 8: Ergebnisse Kollagengehalt im musculus soleus

	Kollagengehalt in %	SD
trpv4 ^{-/-}	5,12	1,413912
BL/6J	4,85	1,121262
<i>mdx</i>	10,2	1,416473
BL/10	5,06	0,869089

Tabelle 9: Ergebnisse Kollagengehalt im musculus tibialis anterior

	Kollagengehalt in %	SD
trpv4 ^{-/-}	5,35	1,336631
BL/6J	5,04	0,838643
<i>mdx</i>	10,48	1,43837
BL/10	5,26	0,951978

Tabelle 10: Ergebnisse Kollagengehalt im musculus extensor digitorum longus

	Kollagengehalt in %	SD
trpv4 ^{-/-}	5,36	1,459826
BL/6J	4,3	1,303382
<i>mdx</i>	11,47	3,173783
BL/10	4,46	1,725211

Tabelle 11: Ergebnisse Kollagengehalt im Diaphragma

9.3 Ergebnisse Fasertypisierung

Angegeben ist der prozentuale Anteil für jeden Fasertyp sowie die Standardabweichung (SD).

	Fasertyp						
	I	I/IIA	IIA	IIA/IIX	IIX	IIX/IIB	IIB
trpv4 ^{-/-}	34,71	0,2	37,53	0,39	24,87	0,39	1,91
SD	4,258035	0,4065	14,621705	0,7815	12,538273	0,7815	3,8235
BL/6J	35,54	0,71	44,42	1,56	17,77	0	0
SD	6,305444	0,608335	19,277011	1,64116	22,181266	0	0
<i>mdx</i>	53,1	3,45	31,24	3,84	8,37	0	0
SD	13,026234	2,216962	11,915323	4,881105	4,782382	0	0
BL/10	34,96	0,58	47,02	0,68	16,69	0,08	0
SD	3,846815	0,960373	15,000709	0,537183	12,659295	0,1505	0

Tabelle 12: Ergebnisse Fasertypisierung musculus soleus

	Fasertyp						
	I	I/IIA	IIA	IIA/IIX	IIX	IIX/IIB	IIB
trpv4 ^{-/-}	0	0	11,41	1,88	49,12	3,21	34,38
SD	0	0	6,63759572	1,538161	9,759572	2,286132	13,450435
BL/6J	0	0	10,99	0,88	56,48	1,35	30,3
SD	0	0	8,475561	0,842092	6,223813	1,722095	14,284014
<i>mdx</i>	0,71	0,23	9,07	3,48	57,89	4,82	23,81
SD	0,882743	0,4565	9,663924	2,116212	7,949232	2,245508	8,491035
BL/10	0,09	0,09	11,47	1,59	62,86	2,2	21,68
SD	0,1875	0,1875	7,1518	0,97872	11,949242	2,417331	8,993102

Tabelle 13: Ergebnisse Fasertypisierung musculus tibialis anterior

	Fasertyp						
	I	I/IIA	IIA	IIA/IIX	IIX	IIX/IIB	IIB
trpv4 ^{-/-}	0	0	17,06	5,49	17,41	4,71	55,33
SD	0	0	7,773432	8,414217	13,242602	3,760048	11,269207
BL/6J	0	0	13,31	4,79	26,48	4,06	51,37
SD	0	0	2,387388	5,575378	1,611787	2,728889	2,862456
<i>mdx</i>	1,25	0	6,81	2,02	30,95	6,72	52,26
SD	0,025	0	4,302489	2,403838	9,745848	5,245093	7,446802
BL/10	0	0	8,29	2,28	34,28	17,02	38,12
SD	0	0	12,824708	2,129844	11,537869	10,023364	23,024552

Tabelle 14: Ergebnisse Fasertypisierung musculus extensor digitorum longus

	Fasertyp						
	I	I/IIA	IIA	IIA/IIX	IIX	IIX/IIB	IIB
trpv4 ^{-/-}	8,56	0	36,15	4,87	40,03	2,48	7,91
SD	1,270116	0	1,210009	5,00707	7,629852	3,147518	4,26674
BL/6J	10,61	0	38,12	5,44	39,99	2,11	3,73
SD	1,094352	0	7,076933	3,711746	11,823928	1,556177	3,256628
<i>mdx</i>	10,08	0,22	41,53	10,5	33,27	2,77	1,62
SD	5,283685	0,4385	22,391423	11,016725	24,097454	3,991566	1,959064
BL/10	9,33	0	33,09	2,52	47,55	1,17	6,33
SD	2,1179	0	8,3126	1,3521	12,5221	1,3061	7,3865

Tabelle 15: Ergebnisse Fasertypisierung im Diaphragma

10 Danksagungen

Die umfangreichen Experimente zur Anfertigung der dieser Arbeit zugrunde liegenden histologischen Präparate wurden im Sommer und Herbst 2013 und im Sommer 2014 im Institut für Pathophysiologie der Universität Greifswald unter der Leitung von Professor Heinrich Brinkmeier während des klinischen Abschnitts meines Studiums der Humanmedizin durchgeführt.

Mein tiefer Dank gebührt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. rer. nat. Heinrich Brinkmeier, dem Direktor des Instituts. Ich danke für die Möglichkeit, die umfangreichen experimentellen Untersuchungen zur Erstellung von Färbeprotokollen, Anfertigung der Präparate und Etablierung neuer Methoden (Fluoreszenzmikroskopie) in den Räumlichkeiten des Instituts durchzuführen. Zudem danke ich für die ständige fachliche und menschliche Unterstützung zu jedweder Fragestellung und jedweder Zeit. Nicht zuletzt danke ich für die Möglichkeit, die erhobenen Daten auf der 95. Jahrestagung der deutschen physiologischen Gesellschaft in mündlicher Präsentation in Lübeck vorzustellen und der fachlichen Diskussion zugänglich zu machen.

Ich danke dem wissenschaftlichen Team des Instituts, allen voran Frau Dr. Mirjam Krautwald für die fortlaufende Unterstützung, die Anleitung, die Offenheit und menschliche Art in der Problemlösung. Ihre Ideen, Anregungen und Förderung haben wesentlich zur Strukturierung und Entwicklung dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke meinem geschätzten Kollegen und Freund Christian Kesselring, dessen Experimente im Rahmen seiner Dissertation zeitgleich im Institut durchgeführt wurden, für die fachliche Unterstützung, seine Ideen und seine außergewöhnlich humorvolle Art.

Insbesondere möchte ich die Unterstützung durch meine Familie hervorheben. Ich danke meinen Eltern für den stets interessierten Beistand und den ausdauernden Rückhalt. Nicht zuletzt gebührt mein aufrichtiger und liebevoller Dank meiner Ehefrau Lisa Dreist, ohne deren tatkräftiges Wohlwollen die Entstehung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ihre außergewöhnliche Belastbarkeit und Strapazierfähigkeit in den vielen Stunden, Wochen und Monaten der Erarbeitung verdienen höchste Anerkennung und von Herzen empfundene Dankbarkeit.