

Aus dem Institut für Pathophysiologie
(Direktor Univ.- Prof. Dr. H. Brinkmeier)
der Universitätsmedizin
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Zur Rolle des Kationenkanals TRPC6 für den Kalziueinstrom
normaler und Dystrophin-defizienter Skelettmuskelfasern
der Maus**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2013

vorgelegt von:
Christoph, Sinnhöfer
geb. am: 03.11.1984
in: Berlin-Pankow

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar

1. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Brinkmeier

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Noack

Ort, Raum: Institut für Physiologie, Karlsburg

Tag der Disputation: 21. Februar 2014

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen:

[...]_i	intrazelluläre Konzentration
[...]_e	extrazelluläre Konzentration
BMD	Muskeldystrophie Typ Becker
BTS	N-Benzyl- <i>p</i> -toluenesulphonamid
C-C	Coiled-coil (3D Struktur eines Proteins)
c/h	Canonical and hidden
Ca²⁺	Calciumion
CK	Kreatinkinase
CMD	Congenital-Muscular-Dystrophy
CMD/CDI	Domäne des STIM1, welche die Kalzium abhängige Inaktivierung vermittelt
COOH	Carboxygruppe (carboxyterminales Ende eines Proteins)
CR	Cysteinerich domain
DAG	Diacylglycerin
DAPs	Dystrophin-Associated-Glycoproteins
DCG	Dystrophin-Dystroglycan-Komplex
DGC	Dystrophin-Glykoprotein-Komplex
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMD	Muskeldystrophie Typ Dychenne
DMSO	Dimethylsulfoxid
EF	EF Handmotiv (Kalziumsensor)
ERM	Zytoplasmatische Domäne des STIM1
EZL	Extrazellulärlösung
FCS	Fetal calf serum
GRC	Growth-Factor-Regulated-Channels
Grb2	Growth-Factor-Receptor-Bound-Protein-2
HEK	Human embryonal kidney
HEPES	K-N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HH	Highly homologous
HS	Horse serum

iCRAC	Kalziumeinstrom durch Calcium-Release-Activated-Channels (synonym zu SOCE)
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
K	Domäne des STIM1 mit multiplen Funktionen
K⁺	Kaliumion
LGMD2C-F	Limb-Girdle-Muscular-Dystrophy 2C-F
Mdx	X-Linked-Muscular-Dystrophy (der Maus)
ML-9	1-[(5-chloro-1-naphthalenyl)sulfonyl]hexahydro-1H-1,4-diazepin, monohydrochlorid
Mn²⁺	Manganion
Na	Natriumion
NH₂	Aminogruppe (aminoterminales Ende eines Proteins)
PBS	Phosphate buffered saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PLC	Phospholipase C
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
ROC	Receptor-Operated-Channels
RyR	Ryanodinrezeptor
S/P	Serinreiche, alternierend phosphorylierbare Domäne des STIM1
SAC	Stretch-Activated-Channel
SAM	Domäne des STIM1, welche funktionell für die Oligomer- und Clusterbildung zuständig ist
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic-Reticulum-Calcium-ATPase
SIC	Stretch-Inactivated-Channel
SOAR	Domäne des STIM1, welche mit dem C-Terminus des Orai interagiert und so die Kanäle öffnet
SOCE	Store-Operated-Calcium-Entry
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STIM1	Stromal-Interaction-Molecule-1
TM	Transmembrane

TRPC	Transient-Receptor-Potential-Canonical
TRPM	Transient-Receptor-Potential-Melastatin-Related
TRPML	Transient-Receptor-Potential-Mucolipin-Related
TRPP	Transient-Receptor-Potential-Polycystin-Related
TRPV	Transient-Receptor-Potential-Vanilloid-Related
WT	Wildtyp (Kontrollmausstamm)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne und das Tiermodell der mdx-Maus	8
1.2 Die Funktion des Dystrophins	9
1.3 Theorien zum Pathomechanismus der Duchenne-Muskeldystrophie	11
1.4 Die Rolle der intrazellulären Kalziumkonzentration	12
1.5 Transmembranäre Kalziumkanäle	13
1.6 Die TRP-Kanal-Familie	19
1.7 Zielsetzung	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Tiermodelle	21
2.2 Gewinnung von Skelettmuskelfasern	21
2.3 Muskelpräparation	21
2.4 Fluoreszenzmessungen	23
2.5 Die Mangan-Quench-Technik	27
2.6 Praktische Durchführung der Messungen	28
2.7 Geräte und Chemikalien	29
2.8 Statistik	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Einführende Untersuchungen	32
3.2.1 Vergleich der Quenchraten in Wildtyp- und mdx-Skelettmuskelfasern	34

3.2.2	Vergleich der Quenchraten mit dem aktiviertem SOCE	34
3.2.3	Vergleich der SOCEs in Wildtyp- und mdx-Skelettmuskelfasern	36
3.2.4	Der Einfluss des TRPC6-Blockers ML-9 auf den Kalziumeinstrom in Skelettmuskelfasern	37
3.2.5	Kontrollmessungen	45
4.	Diskussion	47
4.1	Stärken und Grenzen der gewählten Methode	47
4.2	Probleme und deren Vorbeugung	49
4.3	Der erhöhte Influx von Kalzium in mdx-Skelettmuskelzellen	50
4.4	TRPC6 und der basale Kalziumeinstrom	51
4.5	TRPC6 und der SOCE	52
4.6	Ausblick	54
5.	Zusammenfassung	55
6.	Literaturverzeichnis	56
7.	Danksagung	71

1. Einleitung

Muskeldystrophien sind genetisch bedingte Erkrankungen, die mit Degeneration der quergestreiften Muskulatur sowie bindegewebigem Muskeleratz einhergehen. Nach dem Modus der Vererbung unterscheidet man X-chromosomal-rezessive, autosomal-rezessive und autosomal-dominante Dystrophien. Die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne zählt zu den X-chromosomal-rezessiv vererbten Formen.

1.1 Die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne und das Tiermodell der mdx-Maus

Mit einer Inzidenz von 1:3300 ist die Muskeldystrophie Typ Duchenne (DMD) die häufigste unter den derzeit bekannten Muskeldystrophien. Durch ihren X-chromosomal-rezessiven Erbgang betrifft die DMD fast ausschließlich Jungen.

Die DMD hat eine sehr schlechte Prognose. Zwischen dem dritten und vierten Lebensjahr beginnt die Manifestation der Krankheit in Form von Muskeldegeneration und den damit verbundenen Haltungs- und Gangstörungen. Bei drei Viertel der Betroffenen manifestiert sich die Erkrankung zusätzlich durch eine dilatative Kardiomyopathie, welche um das 20. Lebensjahr auftritt. In etwa einem Drittel der Fälle ist auch die geistige Entwicklung beeinträchtigt. Tödlich verläuft die DMD durch die zunehmende Einschränkung der Atmung, sowie der Herzinsuffizienz, aber auch durch Krankheiten im Zusammenhang mit der Bettlägerigkeit, wie etwa Infektionen. Die Lebenserwartung beträgt durchschnittlich 20 bis 30 Jahre. Mikroskopisch imponiert die DMD durch den Ersatz des funktionsfähigen Muskelgewebes durch Binde- und Fettgewebe.

Das für die Krankheit verantwortliche Gen wurde erstmals Anfang der achtziger Jahre identifiziert. Es befindet sich auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms an der Stelle Xp21.2 (Murray et al., 1982) (Monaco et al., 1986). Dieses Gen ist mit seinen 2.4 Millionen Basenpaaren das größte bekannte Gen des Menschen. Seine Größe ist ursächlich für die hohe Mutationsrate und für zahlreiche Mutationsorte und -formen (Danieli et al., 1993). Als entsprechendes Genprodukt wurde Dystrophin identifiziert (Hoffman, Brown und Kunkel, 1987), welches bei der DMD nicht exprimiert wird.

Bulfield (Bulfield et al., 1984) fand 1984 Mäuse mit ähnlichen Symptomen wie bei DMD Patienten. Diese Mäuse wurden mdx-Mäuse (X-Linked-Muscular-Dystrophy) genannt und sind heute das am häufigsten eingesetzte Tiermodell zur Erforschung der DMD.

1.2 Die Funktion des Dystrophins

Dystrophin ist ein submembranöses Zytoskelettprotein mit einem Molekulargewicht von 427 kDa (Hoffman, Brown und Kunkel, 1987), welches in allen Muskeltypen vorkommt. Es stellt eine Verbindung des intrazellulären F-Aktins des Zytoskeletts (Way et al., 1992) mit den Dystrophin assoziierten Glykoproteinen (DAP) (Campbell und Kahl, 1989) (Suzuki et al., 1992), welche wiederum über Laminin mit der Lamina Densa der extrazellulär Matrix verbunden sind, her (siehe Abb.1.1). Die DAPs werden nach ihrer Lokalisation in drei Gruppen eingeteilt: extrazelluläre (Laminin und alpha-Dystroglykan), transmembranäre (Sakroglykane und beta-Dystroglykane) und intrazelluläre Proteine wie z.B. Dystrophin und Utrophin (Brown, 1997). Utrophin ist dem Dystrophin ähnlich und kommt an dessen Stelle in den Postsynapsen der neuromuskulären Endplatte vor. Mutationen in Genen, welche für DAPs kodieren, können wiederum selber zu zahlreichen Dystrophieformen führen (Dalkilic und Kunkel, 2003).

Dystrophin unterteilt sich strukturell in vier verschiedene Domänen: eine N-terminale Aktin-Bindungsstelle, eine zentrale „Rod-Domäne“ mit 24 repetitiven Sequenzen, einer cysteinreichen Domäne und der C-terminalen Domäne (Koenig, Monaco und Kunkel 1988), welche strukturell starke Ähnlichkeit mit den Syntrophinen und Dystrobrevinen aufweist.

Das Dystrophinmolekül bindet mit seinem N-Terminus an nichtsarkomerische Aktinfilamente, mit seinem C-Terminus-nahen Teil an das β -Dystroglykan. Extrazellulär vermitteln α -Dystroglykan und Laminin-2 (Merosin) die Bindung an die Basallamina. Mit dem C-Terminus stellt das Dystrophin eine Verbindung zum Dystrobrevin her (Sadoulet-Puccio, Rajala und Kunkel 1997).

DAPs und Dystrophin bilden zusammen eine membranspannende Einheit, den Dystrophin-Dystroglycan-Komplex (DCG) (Jung et al., 1995) (Rafael und Brown, 2000) (Cohn und Campbell, 2000). Für die dauerhafte Überlebensfähigkeit des Muskels ist ein intakter DCG unabdingbar (Hoffman, Brown und Kunkel, 1987) (Straub und Campbell, 1997). Eine wichtige Funktion scheint also der Schutz der Zellmembran gegenüber mechanischer Beanspruchung zu sein (Petrof et al., 1993) (Pasternak, Wong und Elson 1995) (Menke und Jockusch, 1995).

Des Weiteren hat das Dystrophin im DCG verschiedene nicht strukturelle Funktionen. Die Position des DCG und seiner assoziierten Proteine direkt an der Schnittstelle zwischen Zellinnen- und Zellaußenraum verleiht ihm eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung und Weitergabe verschiedener Signale.

So verankert Dystrophin die Stickstoffmonoxid-Synthase an der inneren Oberfläche der Zellmembran (Grozdanovic und Baumgarten, 1999). Des Weiteren spielt der DCG eine Rolle bei der Rekrutierung von Rac1 (Oak, Zhou und Jarrett, 2003) (Zhou et al., 2007), der Grb2 Signalkaskade (Yang et al., 1995) und der DAG-Kinase-Signaltransduktion (Abramovici et al., 2003).

Auch für die Regulation der Kalziumhomöostase wird eine Beteiligung des Dystrophins diskutiert. In mdx-Mäusen und DMD-Patienten sind die intrazellulären Kalziumspiegel relativ zu den Kontrollen erhöht (Fong et al., 1990) (Turner et al., 1991). Außerdem konnte durch Wiedereinbringung von Minidystrophin, in dystrophische Zellen, eine Normalisierung des Kalziumhaushaltes erreicht werden (Vandebrouck et al., 2007).

Das Fehlen des Dystrophins führt zu Nekrosen und Fibrosierungen des Muskelgewebsverbundes, wodurch sich die Krankheit manifestiert.

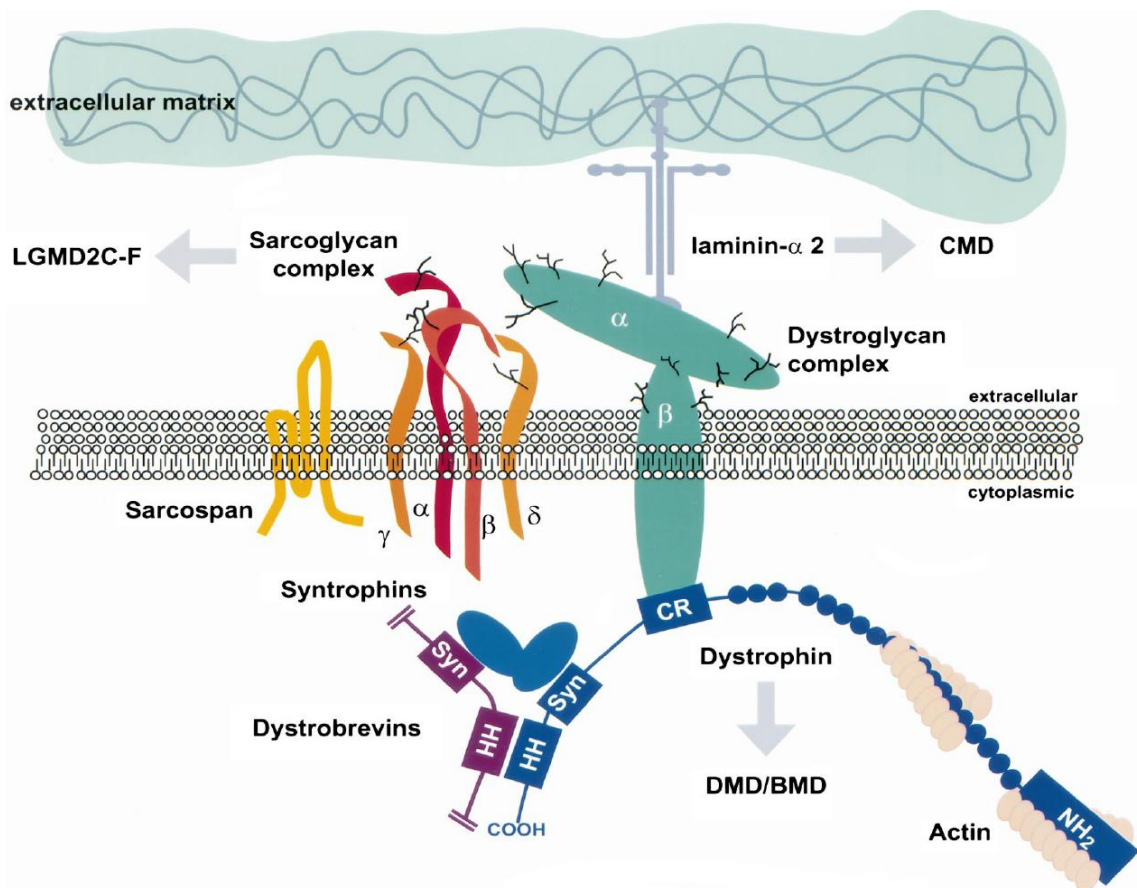


Abb. 1.1:
Struktur und Lokalisation des Dystrophins in der Muskelfaser

Zu sehen sind das Dystrophin und die mit ihm assoziierten Strukturproteine. Sie dienen unter Anderem der Koppelung des Zytoskeletts mit der Zellmembran, aber auch für die Weiterleitung von Signalkaskaden spielen sie eine wichtige Rolle.

CR - cysteinereich; HH - highly homologous; LGMD – limb girdle muscular dystrophy; CMD – congenital muscular dystrophy.

Quelle: O'Brien und Kunkel, 2001

1.3 Theorien zum Pathomechanismus der Duchenne-Muskeldystrophie

Ogleich das Wissen über die molekularen Grundlagen der DMD zu großen Teilen vorhanden ist, so bleibt noch immer ungeklärt wie genau sich das Fehlen des Dystrophins auf die Pathogenese der DMD auswirkt.

Eine gängige Hypothese geht davon aus, dass die Degeneration der DMD-Muskelzellen aus einer chronischen Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung entsteht, welche zur Degradation von Muskelproteinen führt (Turner et al., 1988) (MacLennan, McArdle und Edwards 1991), bisher ist jedoch nicht geklärt, ob die Konzentrationserhöhungen des Kalziums der Grund für die Degeneration der Muskelzellen sind oder nur ein damit verbundenes Phänomen. Die Kalziumhomöostase der Muskelzelle wird unter anderem durch die elektrische Spannung über der Plasmamembran reguliert, welche wiederum von sarkolemmalen Ionenkanälen abhängig ist. Die Nähe des Dystrophins zur Plasmamembran könnte auf einen Zusammenhang zwischen fehlendem Dystrophin und veränderter Kalziumpermeabilität der Plasmamembran schließen lassen.

Unklar ist auch, ob die Wirkung des fehlenden Dystrophins über eine Membranschädigung oder durch eine Konformationsänderung an den kalzium-leitenden Kanälen ausgelöst wird. Möglich ist jedoch auch eine Kombination aus beidem.

Derzeit wird ein pathophysiologisches Modell diskutiert, in dem membranständige Kalziumkanäle die entscheidende Rolle spielen.

1.3.1 Die mechanische Instabilitätstheorie

Diese Theorie geht von einer geschädigten Plasmamembran als Ursache der erhöhten Kalziumkonzentration aus (Petrof et al., 1993) (Claflin und Brooks, 2008). Für eine geschwächte Permeabilitätsbarriere für gelöste Stoffe spricht die Tatsache, dass das Sarkolemm entsprechender Muskelfasern für sarkoplasmatische Proteine, wie beispielsweise die Kreatinkinase (CK), vermehrt durchlässig ist (Kiessling und Beckmann, 1981) (Florence et al., 1985). Der Verlust der CK geht dabei der Muskelfaserdegeneration voraus. Bei Patienten mit Duchenne-Muskeldystrophie und bei mdx-Mäusen erreicht die Konzentration der CK im Blutplasma dadurch Werte die den Referenzbereich um das bis zu einhundertfache übersteigen können. Ebenso betroffen sind andere muskelspezifische Proteine wie die Pyruvatkinase, Myoglobin (Kiessling und Beckmann, 1981) (Florence et al., 1985) und Parvalbumin (Jockusch et al., 1988). Außerdem konnte mittels extrazellulär appliziertem Evans-Blue, welches eine starke Affinität für Serumalbumin hat, eine Passage des Albumins

in die Muskelzellen von mdx-Mäusen nachgewiesen werden (Matsuda, Nishikawa und Tanaka 1995).

1.3.2 Die Ionenkanaltheorie

Die zweite Theorie geht davon aus, dass Ca^{2+} durch, in ihrer Aktivität veränderte, Kalziumkanäle in die Dystrophin-defizienten Skelettmuskelzellen eindringen kann.

Grundlage für diese Annahme ist die bereits erwähnte Nähe des Dystrophins und seiner assoziierten Proteine zur Plasmamembran. Die subsarkolemmale Lage prädestiniert zu der Annahme von Wechselwirkung mit transmembranären Kanalproteinen, was auch durch Studien belegt ist (Ervasti and Campbell, 1993) (Campanelli et al., 1994) (Blake et al., 2002) (Vandebrouck et al., 2007).

Ein weiteres Indiz für diese Theorie ist die gleich bleibende Natriumpermeabilität (Turner et al., 1991). Bleibt die Natriumpermeabilität konstant, während die Kalziumpermeabilität steigt, ist eine generelle, unspezifische Steigerung der Membranpermeabilität unwahrscheinlich.

Die Frage welche Kanäle daran beteiligt sind, ist jedoch noch unzureichend geklärt. Einige Autoren berichten von erhöhter Aktivität mechanosensitiver Kalziumkanäle (Suchyna und Sachs, 2007) (Franco-Obregon und Lansman, 1994) (Lansman und Franco-Obregon, 2006). Aber auch so genannte Ca^{2+} leak channels (Fong et al., 1990) (Turner et al., 1993) (Alderton und Steinhardt, 2000), Growth-Factor-Regulated-Channels (GRC) und der Store-Operated-Calcium-Entry (SOCE) (Vandebrouck et al., 2002) haben die Aufmerksamkeit der Wissenschaft auf sich gezogen.

1.4 Die Rolle der intrazellulären Kalziumkonzentration

Ungeachtet der Tatsache, dass wir nicht genau wissen wie die Störung der Kalziumhomöostase eigentlich zustande kommt, so einig ist man sich, dass sie existiert.

Diskutiert werden sowohl eine generelle dauerhafte Erhöhung der Kalziumkonzentration (Fong et al., 1990) (Turner et al., 1991), ein gesteigerter Influx (Hopf et al., 1996) (Tutdibi et al., 1999) (De Backer et al., 2002), welcher durch zelluläre Mechanismen kompensiert wird als auch eine subsarkolemmale Erhöhung der Ca^{2+} Konzentration (Mallouk, Jacquemond und Allard, 2000).

Wenn auch derzeit eher von unveränderten intrazellulären Spiegeln des freien Ca^{2+} unter Ruhebedingungen bei kultivierten DMD- und mdx-Myotuben (Rivet-Bastide et al., 1993) (Collet et al., 1999) und mdx-Fasern (De Backer et al., 2002) (Gailly et al., 1993) (Pressmar et

al., 1994) ausgegangen wird, so können doch starke mechanische Beanspruchungen dauerhaft überhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel in Skelettmuskelfasern von DMD-Patienten und mdx-Mäusen hervorrufen. Hypoosmotischer Stress als Modell für mechanische Belastung vermag zum Beispiel einen Ca^{2+} -Einstrom hervorzurufen (Pressmar et al., 1994), der in mdx-Myotuben stärker ausgeprägt ist als bei entsprechenden Kontrollversuchen.

Für einen gesteigerten Influx von Ca^{2+} -Ionen in mdx-Myotuben und Fasern sprechen Experimente, welche mit Hilfe der Mangan-Quench-Technik durchgeführt wurden (Hopf et al., 1996) (Tutdibi et al., 1999).

Unabhängig davon, dass das Sarkolemm für eine ganze Reihe von Molekülen bei der DMD durchlässig ist, so ist der überhöhte Einstrom von Ca^{2+} sicherlich pathogenetisch der entscheidende Faktor (Mariol und Segalat, 2001).

Ein gesteigerter intrazellulärer Kalziumgehalt wirkt über verschiedenste Mechanismen zelltoxisch. So führt die Störung des Kalziumkreislaufes zur Überladung von Mitochondrien, was zum Anschwellen dieser Zellorganellen führt. Aber auch die Aktivierung der Protease Calpain und die Zerstörung der Plasmamembran durch Phospholipidhydrolyse, infolge der Aktivierung von Phospholipase A2, gehören zur zelltoxischen Wirkung des Kalziums.

Daher wird heute davon ausgegangen, dass infolge der genannten Prozesse apoptotische (Matsuda, Nishikawa und Tanaka, 1995) Veränderungen eingeleitet werden und somit der Krankheitsverlauf der DMD voranschreitet. Die Theorie stützend konnte an mdx-Mäusen gezeigt werden, dass der muskuläre Ca^{2+} -Gehalt mit dem Alter der Mäuse ansteigt.

1.5 Transmembranäre Kalziumkanäle

Die erhöhten subsarkolemmalen Kalziumkonzentrationen könnten durch einen verstärkten Influx durch kalziumpermeable Membrankanäle zustande kommen. Eine beträchtliche Anzahl von Arbeiten hat sich damit beschäftigt die Kanäle zu identifizieren, die dabei eine Rolle spielen. Beachtlich ist dabei vor allem die Bandbreite der möglichen Kandidaten, wie bereits erwähnt wurde.

Einige der in Frage kommenden Kanaltypen werden im Folgenden erläutert. Von besonderer Wichtigkeit wird es sein herauszufinden, wie die Kanaltypen in Beziehung zueinander stehen und was ihr eigentlicher Anteil am Pathomechanismus der Duchenne Muskeldystrophie ist.

1.5.1 Spannungsabhängige Kalziumkanäle

Bei der Aktivierung von Muskelfasern durch neuronale Aktivität spielen vor allem zwei Kanaltypen eine Rolle.

Zunächst führt der neuronale Reiz, an der motorischen Endplatte, zum Entstehen eines Aktionspotentials. Dieses führt zur Aktivierung des Dihydropyridinrezeptors (DHPR) in den T-Tubuli. Der DHPR ist also spannungsabhängig. Er ist wiederum mechanisch mit einem zweiten Kalziumkanal, dem Ryanodinrezeptor (RyR) gekoppelt. Durch die mechanische Koppelung wird der RyR aktiviert. Er ist also nicht spannungsabhängig. Der RyR ist in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert und führt durch seine Aktivierung zur Freisetzung von Ca^{2+} in das Zytosol. So kann im Muskelgewebe der Querbrückenzyklus eingeleitet werden.

1.5.2 Mechanosensitive Membrankanäle

Dabei handelt es sich um eine sehr heterogene Kanalgruppe. Sie können sowohl selektiv durchlässig für Ca^{2+} sein, als auch unspezifisch für Kationen. In vielen Zelllinien wurden bereits durch mechanische Beanspruchung aktivierbare Kanäle beobachtet, so auch in Skelettmuskelzellen. Besonders hervorzuheben haben sich dabei die Arbeitsgruppen um Franco-Obregon und Lansman, die einen durch Zug aktivierbaren Kanal (SAC) sowohl in Kontroll- als auch mdx-Muskelfasern nachweisen konnten (Franco-Obregon und Lansman, 1994). Die Offenwahrscheinlichkeit war sowohl in mdx-Myotuben als auch in mdx-Fasern höher im Vergleich zur Kontrolle. Die Autoren mutmaßen, dass sich die verminderte Stabilität der Plasmamembran auf die erhöhte Aktivität der Kanäle auswirkt.

Des Weiteren berichteten sie von einem durch Zug inaktivierbaren Kanal (SIC) (Lansman und Franco-Obregon, 2006) (Suchyna und Sachs, 2007), der allerdings nur in mdx-Muskelzellen vorkam. Wahrscheinlich handelt es sich bei beiden Typen jedoch um den gleichen Kanal, wobei etwaige Artefakte durch das Ansaugen der Patch-Clamp-Pipette hervorgerufen wurden. Andere Arbeitsgruppen fanden zumindest indirekte Hinweise auf durch Dehnung aktivierbare Kanäle. So konnte der Mangan-Quench (siehe 2.5) durch einen SOCE-Inhibitor (SOCE siehe 1.5.5) nicht verringert werden. Auch Nifedipin, ein Aktivator der Kalziumleak-Channels, hatte keinen Einfluss auf den Quench. Im Gegensatz dazu konnte Gd^{3+} , ein Inhibitor der mechanosensitiven Kanäle, den Quench verringern.

Einige Autoren gehen davon aus, dass die SACs vor allem beim bewegungsinduzierten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine wichtige Rolle spielen, aber dies sowohl in mdx- als auch

Kontrollgruppen. Eine exzentrische Muskelkontraktion führt zu einer persistierenden Depolarisation und zu gesteigerten Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen, die in dystrophischen Muskeln stärker sind. Die extrazelluläre Applikation von Gd^{3+} kann diese Konzentrationserhöhung normalisieren.

Außerdem können Blocker der mechanosensitiven Kanäle den Verlust an Kraft verhindern, welcher normalerweise nach exzentrischen Kontraktionen auftritt und in mdx-Zellen stärker ausgeprägt ist, was suggeriert, dass der Ca^{2+} -Influx über die mechanosensitiven Kanäle der Grund für die Kraftverminderung sein könnte.

1.5.3 Wachstumsfaktor regulierte Kanäle (GRCs)

Dabei handelt es sich um einen Kanal der TRP Familie, welcher durch IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) oder mechanische Beanspruchung aktiviert wird. Seine Aktivität ist in Dystrophin-defizienten Skelettmuskelzellen im Vergleich zur Kontrolle gesteigert. Er führt zu gesteigertem Kalziuminflux und das Ausmaß der Kardiomyopathie-Manifestation bei der Maus geht mit seiner Aktivitätssteigerung einher (Iwata et al., 2003). Normalerweise befindet er sich in Vesikeln des Zytoplasmas, aber durch Stimulation kann er in die Plasmamembran translozieren. Die Translokation ist kalziumabhängig und durch Ruthenium-Red (ein Blocker bestimmter TRP-Kanäle, sowie der SR-Freisetzung) inhibierbar.

Wahrscheinlich handelt es sich bei diesem Kanal um den TRPV2 Kanal. Experimente mit mdx-TRPV2-knockout-Mäusen zeigten einen signifikanten Rückgang der intrazellulären Kalziumkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe (Iwata et al., 2009). Es wird daher angenommen, dass der TRPV2 Kanal eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Duchenne-Muskeldystrophie spielen könnte (Zanou et al., 2009).

1.5.4 Calcium leak channels

Dabei handelt es sich um nicht mechanosensitive Kanäle. Sie sind vor allem bei einem intrazellulären Kalziumverlust aktiviert und bewirken dadurch das Auffüllen der Ca^{2+} -Speicher der Zelle. Diese Kanäle können durch Nifedipin aktiviert werden und sind durch andere Dihydropyridine hemmbar.

Die leak channels scheinen eine wichtige Rolle bei der Regulation der kalziumabhängigen Proteolyse zu spielen und werden ihrerseits durch die Proteolyse reguliert.

Eine Inhibition der leak channels reduziert die kalziumabhängige Proteolyse auf Kontrollniveau (Alderton und Steinhardt, 2000). Dem gegenüber steht eine Verminderung der

Aktivität der leak channels durch Proteolysehemmer (Turner et al., 1993), was einen positiven Feedback-Mechanismus vermuten lässt. Leakchannels, die sich nahe an einem künstlich, durch Pipettenansaugung, erzeugten Membranloch befinden, sind signifikant aktiver als weiter entfernt liegende Kanäle. Diese Aktivitätssteigerung kann durch Inhibitoren kalziumabhängiger Proteasen verhindert werden (McCarter und Steinhardt, 2000).

1.5.5 Der Store-Operated-Calcium-Entry (SOCE)

SOCE steht für Store-Operated-Calcium-Entry und meint damit einen, durch Entleerung des sarkoplasmatischen Retikulums, gesteigerten Influx von Kalzium von extrazellulär über die Plasmamembran. Synonym wird häufig der Begriff iCRAC verwendet, was für Calcium-Release-Activated-Channels steht.

Der iCRACM1 wurde schon vor einiger Zeit entdeckt (Hoth und Penner, 1992) und bereits in vielen Zelltypen beobachtet (Parekh, Fleig und Penner, 1997). Ungeklärt ist jedoch die Frage welche Kanäle genau für diesen Kalziumeinstrom verantwortlich sind. Als mögliche Kandidaten wurden die Transient-Receptor-Potential-Channel (TRPC) Familie (Vandebrouck et al., 2002) und Orai (Parekh, Fleig und Penner, 1997) ausgemacht.

Die Aktivität der SOCE Kanäle wird durch die Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher, durch Thapsigargin oder Koffein, signifikant erhöht.

Auch konnte gezeigt werden, dass durch si-RNA-Repression von TRPC1 oder TRPC4 (Vandebrouck et al., 2002) das Auftreten von mechanosensitiven Kanälen verringert wird. Außerdem konnte an Myotuben gezeigt werden, dass TRPC1 für einen mechanosensitiven Kanal kodiert (Maroto et al., 2005). Beides spricht dafür, dass SOCE Kanäle und mechanosensitive Kanäle die gleiche Entität darstellen könnten, deren Aktivität in dystrophischen Muskelzellen erhöht ist.

Allerdings konnte dieser mechanosensitive Kanal nicht mit 2-Amino-Ethoxy-Diphenyl-Borat (2-ABP), einem Inhibitor des SOCE in anderen Zelltypen, inhibiert werden, was für einen Unterschied zum SOCE in Muskelzellen spricht. Möglich erscheint hier ein anderer TRPC Kanal als Träger des SOCE.

1.5.5.1 Der Mechanismus des SOCE

Heute sind bereits detailliertere Modelle des Store-Operated-Calcium-Entry vorhanden.

Zunächst wird eine Kalziumentleerung des SR, zum Beispiel bei Muskelkontraktion, über ein Kalziumsensormolekül, das Stromal-Interaction-Molecule-1 (STIM1), detektiert (Liou et al.,

2005) (Roos et al., 2005). STIM1 befindet sich gleichmäßig verteilt in der Membran des SR und besitzt ein EF-Handmotiv (Dziadek und Johnstone, 2007), welches in das Lumen des sarkoplasmatischen Retikulums ragt und dort einen Abfall der $[Ca^{2+}]$ misst (Stathopoulos et al., 2006). Entleert sich das Kalzium aus dem SR so aggregiert STIM1 zu so genannten Punktae (Smyth et al., 2008), Konglomeraten von STIM1, in Sarkolemm nahen Bereichen der SR-Membran. Wird das SR durch die SERCA wieder mit Kalzium aufgefüllt, so begeben sich die STIM1 Moleküle wieder zurück in ihre ursprüngliche Anordnung, verteilt über die SR-Membran.

Die STIM1-Punctae des entleerten SR stellen eine Verbindung zu sarkolemmalen transmembranären Kanalproteinen, der Orai- (Lis et al., 2007) (Zhang et al., 2006) oder der TRPC-Familie (Yuan et al., 2007) (Worley et al., 2007) (Zeng et al., 2008) her und aktivieren so einen Kalziumeinstrom.

Das STIM1 konnte auch in Muskelzellen von Mäusen nachgewiesen werden (Stiber et al., 2008).

1.5.5.2 Das Stromal-Interaction-Molecule (STIM1)

STIM1 ist ein Membranprotein des SR. Es vermittelt Information über den Kalziumgehalt des SR an die Plasmamembran und reguliert dort den iCRAC. STIM1 ist ein Multidomänenprotein von dem bis heute noch nicht alle funktionell wichtigen Domänen entschlüsselt wurden.

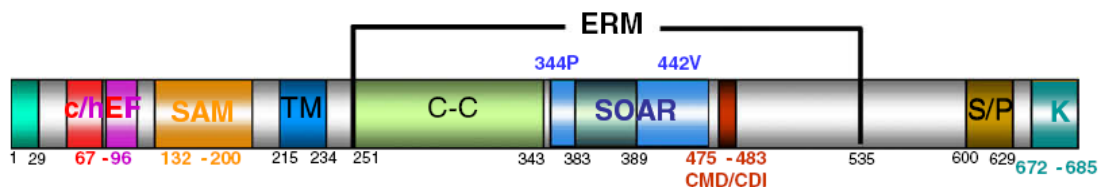


Abb. 1.2.:
Struktur des STIM1 Proteins

*Abgebildet ist das STIM1-Protein mit seinen verschiedenen Domänen.
c/hEF - canonical and hidden EF Handmotiv ; SAM - Domäne, welche funktionell für die Oligomer- und Clusterbildung zuständig ist; TM - transmembrane; C-C - Coiled-coil (3D Struktur eines Proteins) ; SOAR - Domäne, welche mit dem C-Terminus des Orai interagiert und so die Kanäle öffnet ; S/P - serinreiche, alternierend phosphorylierbare Domäne ; K – Domäne mit multiplen Funktionen; ERM - Zytoplasmatische Domäne; Quelle: Lee et al., 2010*

Der STIM1 N-Terminus beinhaltet das EF-Motiv (Stathopoulos et al., 2008), welches, wenn an Kalzium gebunden, die Clusterung zu STIM1 Punctae verhindert (Stathopoulos et al., 2006).

Die SAM-Domäne befindet sich ebenfalls noch im SR-Lumen. Sie ermöglicht die Zusammenlagerung der STIM1-Moleküle zu Punctae. Die Aminosäuresequenzen vor dem EF-Motiv scheinen ebenfalls an der Clusterung beteiligt zu sein und haben Einfluss auf den Aktivierungsgrad der Orai-Kanäle (Zhou et al., 2009). In Richtung C-Terminus folgt die einzige transmembranäre Domäne (TM). Danach beginnt die ERM-Domäne, welche sich in einzelne Unterabschnitte aufteilen lässt. Einer dieser Abschnitte ist SOAR. Dieser bindet an Orai und wird benötigt um diese vollständig zu aktivieren. SOAR interagiert auch mit TRPC Kanälen, ist jedoch nicht hinreichend um diese vollständig zu aktivieren (Yuan, Lee unpublished results). Eine weiter Richtung C-Terminus liegende, 7 Aminosäuren umfassende Region, wird für die Beendigung der Clusterung benötigt (Lee et al., 2009) und heißt CMD/CDI. Am Ende des C-Terminus befindet sich noch ein lysinreicher Abschnitt namens K-Domäne. Sie hilft bei der Verankerung von STIM1 in der Plasmamembran (Liou et al., 2007) und ist direkt an der Öffnung des TRPC1 Kanals beteiligt (Zeng et al., 2008) (Cheng et al., 2011).

Weiterhin steht STIM1 in Kontakt mit dem Mikrotubuli-Netzwerk (Grigoriev et al., 2008). Auch in Skelettmuskelzellen wird STIM1 hoch exprimiert (Kiviluoto et al., 2011).

1.5.5.3 Das Orai-Protein

Bei der Genkartierung von Lymphozyten von Patienten mit SCID (Severe Combined Immuno Deficiency) wurde ein bis dahin unbekanntes Protein entdeckt (Feske et al., 2006) (Yeromin et al., 2006). Dieses Protein namens Orai konnte, wenn es mit STIM1 exprimiert wurde, in vielen verschiedenen Zelllinien einen SOCE auslösen. Bei einem RNAi-Genomscreening an *Drosophila* stellte sich in der Tat heraus, dass es sich bei dem Protein um einen essentiellen Bestandteil des SOCE handelte (Feske et al., 2006). Orai befindet sich in der Plasmamembran der Zelle. Orai wird, wie bereits erwähnt, durch STIM1 aktiviert (Lis et al., 2007) (Zhang et al., 2006). Drei verschiedene Gene, die für strukturähnliche Proteine kodieren, konnten identifiziert werden und mit Orai 1, 2 und 3 benannt (Gwack et al., 2007). Die Orai-Proteine haben vier transmembranäre Domänen mit relativ kurzen N- und C-Termini. Experimentell zeigt Orai, in seiner inaktiven Form, eine Dimerstruktur. Durch SR-Entleerung bildet sich ein aktives Tetramer (Penna et al., 2008).

Der C-Terminus vermittelt die Öffnung des Orai durch Bindung an die SOAR/CAD-Domäne des STIM1 (Park et al., 2009) (Yuan et al., 2009). Am N-Terminus des Orai befindet sich eine Calmodulin-Bindungsstelle (Mullins et al., 2009), welche für die Inaktivierung des SOCE von Bedeutung ist.

1.6 Die TRP-Kanal-Familie

Die Transient-Receptor-Potential Kanäle sind eine Familie nichtselektiver Kationenkanäle. Sie können in sechs Unterfamilien aufgeteilt werden: dabei finden sich der „classical“ oder „canonical“ TRPC Subtyp, die Vanilloid-Receptor-Related- (TRPV1-6), die Melastatin-Related- (TRPM1-8) (Clapham et al., 2003) und die entfernter verwandten Polycystin-Related- (TRPP), Mucolipin-Related-Proteins- (TRPML) sowie TRPA1-Kanäle (Montell et al., 2005).

Die TRPC-Kanäle werden wiederum in sieben Subtypen numerisch eingeteilt. Ihre Gemeinsamkeit besteht in der Aminosäurenstruktur. Ihre Unterschiede bezüglich der Aminosäuresequenzen sind nicht sehr groß, so sind TRPC1 und TRPC2 nahezu identisch. TRPC4 und TRPC5 teilen immerhin noch 65% der Aminosäuren. TRPC3, -6 und -7 bilden eine strukturelle Untergruppe, in der 70-80% der Aminosäuren identisch sind und die Aktivierbarkeit durch DAG, einem Spaltprodukt der Phospholipase C (PLC), gemeinsam haben (Hofmann et al., 1999) (Okada et al., 1999) (Dietrich et al., 2005).

Jeder Kanal wird aus 4 Untereinheiten gebildet. Die Untereinheiten wiederum bestehen jeweils aus sechs Transmembran-Domänen und einer, zwischen den transmembranären Regionen 5 und 6 befindlichen Schleife. 4 dieser Schleifen (von 4 Untereinheiten) tauchen in die Plasmamembran und bilden die Kanalpore. Am N-Terminus aller TRPC-Kanäle befinden sich 4 Ankyrin-Repeat-Sequenzen. Die TRPC-Kanäle bilden funktionelle Homo- oder Heterotetradimere, welche sich aus den Gruppen 1/4/5 oder 3/6/7 zusammensetzen können (Schaefer, 2005) (Hofmann et al., 2002). Die 4 Untereinheiten können also aus 4 gleichen Sequenzen bestehen oder aus verschiedenen Sequenzen innerhalb der jeweiligen Gruppe. Der TRPC2-Kanal kommt bei der Maus vor, beim Menschen handelt es sich jedoch um ein funktionsloses Pseudogen.

Die Beteiligung der TRPC-Kanäle am SOCE wird kontrovers und häufig sehr widersprüchlich geführt (Nilius, 2004). Eine Mehrheit an Arbeiten zu diesem Thema belegt zumindest, dass einige Subtypen der TRPC-Familie mit hoher Wahrscheinlichkeit am Store-Operated-Calcium-Entry mitwirken, insbesondere der TRPC1 hat sich hier hervor getan (Vaca und Sampieri, 2002) (Beech, 2005) (Huang et al., 2006) (Ambudkar, 2007) (Vandebrouck et al., 2007) (Ong und Ambudkar, 2011) (Cheng et al., 2011) (Yuan et al., 2012) (Sundivakkam et al., 2011). Dennoch gibt es auch eine Reihe von Veröffentlichungen, die TRPCs nicht als Teil des SOCE, jedoch als so genannte ROCs (Receptor-Operated-Channels) sehen (Gudermann et al., 2004) (DeHaven et al., 2009) (Patel et al., 2010).

1.6.1 Der TRPC6-Kanal

Auch für den TRPC6-Kanal wurde schon mehrfach eine Assoziation mit dem Store-Operated-Calcium-Entry diskutiert (Liao et al., 2007) (Brechard et al., 2008) (Jardin et al., 2009). Auch als ROC wurde der TRPC6-Kanal bereits beschrieben (Patel et al., 2010). Der Kanal kann direkt durch DAG aktiviert werden (Hofmann et al., 1999), während er durch das Spinnengift GsMTx (Inoue et al., 2009) und ML-9 inhibiert wird (Shi et al., 2007). Wenn auch die Inhibition durch ML-9 nicht spezifisch ist. Der TRPC6 Kanal kommt in Homo- oder Heterotetrameren vor und interagiert mit zytoskelettalen Proteinen (Dietrich und Gudermann, 2007).

In der Skelettmuskulatur von WT-Mäusen und mdx-Mäusen wird TRPC6 stark exprimiert, im Gegensatz zu TRPC1 (Krüger et al., 2008).

1.7 Zielsetzung

Zielstellung dieser Arbeit ist es einen möglichen Einfluss des TRPC6-Kanals auf den Kalziumeinstrom in Skelettmuskelzellen von WT- und mdx-Mäusen zu untersuchen. Dies sollte sowohl in Ruhe als auch nach Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher geschehen. Somit könnte eine Rolle des TRPC6-Kanals im Pathomechanismus der Muskeldystrophie Typ Duchenne beziehungsweise eine Beteiligung des Kanals am Store-Operated-Calcium-Entry nachgewiesen werden.

2. Material und Methoden

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Muskelfasern von Kontrollmäusen und mdx-Mäusen eingesetzt, um die Bedingungen, bei zu Grunde liegender Duchenne-Muskeldystrophie, möglichst realitätsnahe zu gestalten. Die Kalziummessungen wurden mit dem intrazellulären Farbstoff Fura-2 durchgeführt.

2.1 Tiermodelle

Die Muskelfasern stammen von C57BL/10ScSn Mäusen (Wildtyp) und von C57BL/10ScSn-mdx/J Mäusen (mdx-Mäusen), die alle zwischen 70 und 100 Tage alt waren. mdx-Mäuse exprimieren in ihren Skelettmuskeln kein Dystrophin und stellen somit ein tierisches Korrelat zur DMD beim Menschen dar. Sie sind bereits gut erforscht und finden vielfach Anwendung zur experimentellen Darstellung der DMD. Mdx- und Kontrollmäuse entstammten der Tierzucht des Institutes für Pathophysiologie der Universität Greifswald.

2.2 Gewinnung von Skelettmuskelfasern

Die verwendeten Muskelfasern stammten aus dem Musculus interosseus der Mäuse, da der Muskel relativ kurze Fasern enthält, die sich gut isolieren, kultivieren und mikroskopisch beurteilen lassen. Die Entnahme erfolgte in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz und den lokalen Richtlinien für die Tötung von Tieren und Organentnahme.

2.3 Muskelpräparation

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte durch autorisiertes Personal des Institutes für Pathophysiologie der Universität Greifswald. Anschließend wurden beide Hinterbeine abgetrennt und unter Lupenkontrolle auf einer Unterlage fixiert. Die Mm. interossei wurden anschließend frei präpariert und von den knöchernen Ansätzen abgelöst.

Dabei wurde der M. interosseus für Experimente dieser Arbeit eingesetzt und weitere Muskeln anderen Untersuchungsgruppen zur Verfügung gestellt. Die 1 bis 10 mm² großen Muskelfragmente wurden anschließend in das Kulturmedium M1 (Tab. 2.1) gegeben.

Kulturmedium	Bestandteile
M1	DMEM/F12 1% Pen/Strep
M2	DMEM 1% Pen/Strep 0,5% HS 0,5% FCS
Dissoziationslösung	DMEM/F12 1,5mg/ml Kollagenase 2mg/ml Dispase II 1% Pen/Strep
Stopplösung	DMEM/F12 10% FCS 1% Pen/Strep

Tab. 2.1:
Die Kulturmedien

Aufgelistet sind die für die Einzelzellgewinnung benötigten Kulturmedien und ihre jeweiligen Bestandteile. DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Pen/Strep – Penicillin/Streptomycin; FCS – fetal calf serum; HS – horse serum;

2.3.1 Gewinnung von Einzelzellen

Die gewonnenen Gewebstücke wurden daraufhin unter aseptischen Bedingungen in Gewebekulturschalen (Petrischalen) mit Dissoziationslösung (Tab. 2.1) gegeben. Die Schalen wurden bei 37°C und 80 Umdrehungen / min im Inkubator für 45 Minuten aufbewahrt.

Anschließend wurden die Gewebstücke in 2 ml Stopplösung (Tab. 2.1) gegeben, um die Dissoziationsreaktion zu beenden. Dem folgend wurden sie in 10 ml M2 Medium (Tab. 2.1) gegeben und durch wiederholtes Ein- und Aussaugen in eine stumpf geschnittene Pipettenspitze erneut zerkleinert, sodass im Gewebsverbund verbliebene Muskelzellen herausgelöst werden konnten.

2.3.2 Zellaussaat und Kultivierung

Die so erhaltenen Muskelfasern wurden mit jeweils 750 µl M2 Medium in Petrischalen verteilt. Die Petrischalen enthielten 42 mm breite matrixbeschichtete Deckgläser. Die Deckgläser waren zuvor bei 4°C für mindestens eine Nacht gelagert worden um ein möglichst störungsfreies Auftragen der Matrix (BD Matrigel Basement Membrane Matrix, Bedford, MA, USA) gewährleisten zu können. Die Basalmembranmatrix wurde mit Dulbecco's PBS im Verhältnis 1:4 verdünnt.

Damit die Fasern gut anhaften konnten, wurden sie in einem Inkubator mit 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt. Nach 60 Minuten erfolgte eine erneute Zugabe von 750 µl M2 Medium. Nach nochmals 60 Minuten konnte mit den Messungen begonnen werden. Die Zellen wurden bis nach spätestens zwei Tagen verbraucht. Wenn die Zellen über Nacht im Inkubator verblieben, wurde zum Zweck einer optimalen Nährstoffversorgung ein weiteres Mal 750 µl M2 Medium appliziert.

2.4 Fluoreszenzmessungen

Durch eine externe Strahlungsquelle wird ein Molekül in einen angeregten Zustand versetzt. Beim Rückfall in den Ausgangszustand wird die Energie als Fluoreszenz detektierbar. Dabei handelt es sich um die Abgabe eines Photons. Der Vorgang benötigt etwa 10⁻⁸ Sekunden und ist nur in Gegenwart der Strahlungsquelle stabil.

Die Fluoreszenzfarbstoffe besitzen eine Anregungswellenlänge, die meistens dem jeweiligen Absorptionsmaximum entspricht, sowie eine Emissionswellenlänge, die immer länger ist als die des Anregungslichtes.

2.4.1 Fura-2/AM

Für alle Messungen dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM verwendet. Bei Fura-2/AM handelt es sich um 5-Oxazolecrabolsäure, 2-(6-(bis(2-(acetyloxy)methoxy)-2-oxoethyl)amino)-5-(2-(2-(bis(2-(acetyloxy)methoxy)-2-oxoethyl)amino)-5-methylphenoxy)ethoxy)-2-Benzofuranyl (Abb. 2.1).

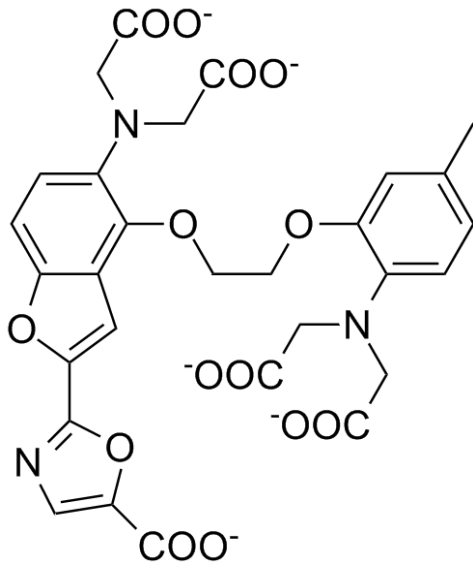


Abb. 2.1:
Fura-2

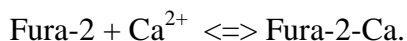
Abgebildet ist die chemische Strukturformel von Fura-2, dem für die Experimente verwendeten Fluoreszenzfarbstoff.

Die membrangängige Form Fura-2/AM entsteht aus einer Veresterung von Fura-2 mit Acetoxymethanol. Durch seine Lipophilie kann es die Membran ohne weiteres passieren und wird anschließend intrazellulär durch unspezifische Esterasen gespalten, sodass es die Zelle nicht wieder verlassen kann bzw. gehindert wird in nennenswertem Umfang in Zellkompartimente einzudringen (Cobbold und Rink, 1987). Der Vorteil des Fura-2 liegt in seiner starken Fluoreszenz im Verhältnis zu seiner Konzentration.

Fura-2 ist ein Chelatkomplexbildner ähnlich dem BAPTA oder auch EDTA. Es besitzt vier Carboxylgruppen, welche die Kalziumionen binden. Die Dissoziationskonstante K_d liegt für Kalzium bei 224 nM, was einer relativ hohen Selektivität entspricht (Grynkiewicz, Poenie und Tsien, 1985).

2.4.2 Messprinzip

In der zu beobachtenden Zelle liegt der Farbstoff in einem Gleichgewicht vor:



Beide Formen emittieren Licht einer Wellenlänge zwischen 510 und 530 nm. Der Kalziumkomplex hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 335 nm. Das freie Fura-2 hat seine größte Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 363 nm (siehe Abb. 2.2). Dadurch, dass die Ionen schnell an Fura-2 binden und auch wieder abgegeben werden (5 ms), lässt sich so rasch eine Veränderung der Kalziumkonzentration detektieren.

In der Praxis hat sich eine alternierende Anregung von 340 / 380 nm durchgesetzt. Bei 360 nm liegt der isosbestische Punkt. Er entspricht der Wellenlänge, bei der die

Emissionsintensität unabhängig von der Kalziumkonzentration ist, er findet Anwendung bei der Mangan-Quench Technik, das 340 / 380-Signal bei den Transientenmessungen.

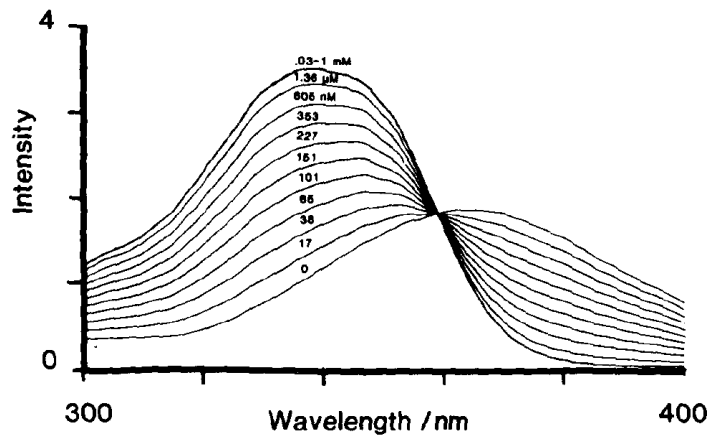


Abb. 2.2:

Eigenschaften von Fura-2

Abgebildet ist das Emissionsspektrum (510nm) von Fura-2 bei verschiedenen $[Ca^{2+}]$. Der Kalziumkomplex hat sein Absorptionsmaximum bei 335 nm. Das freie Fura bei 363 nm. Der isosbestische Punkt liegt bei 360 nm.

Quelle: Gryniewicz, Poenie und Tsien, 1985

2.4.3 Messplatz

Das System besteht aus dem Licht erzeugenden Monochromator (KI Monochromator, Kinetic Imaging Ltd.), dem Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss), einer angeschlossenen CCD-Kamera (Retiga EXB, Q Imaging) sowie einem angeschlossenen Computer zur Verarbeitung der Messdaten.

2.4.4 Mikroskop

Bei dem für die Messungen verwendeten Mikroskop handelt es sich um ein Axiovert 200 von Zeiss Oberkochen. Durch einen Monochromator wird UV-Licht der Wellenlängen 340 / 360 / 380 nm erzeugt, das auf Grund seines Spektrums und hoher Strahlungsintensität im Bereich der Fura-2 Anregungswellen besonders geeignet ist. Im Strahlengang sorgt ein so genannter Fast-Shutter für ein Ausblenden des Lichtes und somit für eine Verhinderung eines

übermäßigen Photobleaching-Effektes. Beim Photobleaching handelt es sich um das Verbleichen des Farbstoffes bei andauernder Lichtanregung. Da die verminderte Fluoreszenz die Messwerte beeinflussen würde, ist ein solcher Effekt zu vermeiden.

Von unten gelangt nun das Licht über einen Spiegel durch ein Ölimmersionsmikroskop (40 x 0,6 LD ACHROPLAN, Zeiss) auf die Probe. Der Spiegel reflektiert das Anregungslicht und lässt gleichzeitig das von der Probe emittierte Licht (510 nm) passieren. Über ein System von Spiegeln und Prismen gelangt das Emissionslicht durch eine Blende zur CCD-Kamera bzw. den Okularen.

2.4.5 Messkammer und Objektisch

Die Deckgläser mit den anhaftenden Muskelfasern wurden in eine ringförmige, an der Innenseite mit einem Gewinde ausgestatteten Messkammer aus Edelstahl eingelegt und mit einer ringförmigen Schraube fixiert. Diese Messkammer wurde danach in eine dafür vorgesehene Halterung des Objektisches eingesetzt.

2.4.6 Software

Bei der Software wurde das Programm Q Imaging von AQM (München, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe des Programms konnten verschiedene Schleifensequenzen erstellt werden. Für die Versuche dieser Arbeit wurde eine Schleife programmiert, welche das Fura (sowohl als Kalziumkomplex als auch das freie Fura) im Abstand von 10 Sekunden bei einer Wellenlänge von 360 nm, also dem isosbestischen Punkt, anregte. Dies wurde innerhalb der Schleife 200 Mal wiederholt, sodass die Emissionsintensität bei 510 nm über die Zeit gemessen werden konnte.

2.4.7 Lösungszufuhr

Die Applikation der Chemikalien erfolgte bei den Mangan-Quench-Messungen durch aufpipettieren selbiger. Es wurde kein Lösungswechsel vorgenommen. Die Lösungen E1, E2 und E3 (siehe Tab. 2.2) wurden in einem Verhältnis gemischt, das keine Konzentrationsänderungen der konstant zu haltenden extrazellulären Elektrolyte verursachte.

2.5 Die Mangan-Quench-Technik

Die so genannte Mangan-Quench-Technik wird verwendet, um die Durchlässigkeit der Zellmembran für zweiwertige Ionen zu testen. Ihr liegt die Tatsache zugrunde, dass Mn-Ionen in etwa die selbe Größe haben wie Ca-Ionen und dadurch über die gleichen Wege in das Innere der Zelle gelangen (Hallam, Jacob und Merritt, 1989). Im Gegensatz zu Kalziumionen werden Manganionen jedoch nicht vom Kalziumtransportsystem erfasst, sodass das Mangan im Zytoplasma akkumuliert.

Die Mn-Ionen binden jedoch an den hier verwendeten Farbstoff Fura-2 und verhindern dadurch konzentrationsabhängig dessen Fluoreszenz (McDonough und Button, 1989). Eben diese Auslöschung (engl. quench) des Fluoreszenzsignals kann daher indirekt als Indikator für den Influx von Ca-Ionen verwendet werden (McDonough und Button, 1989).

Die Membranleitfähigkeit für divalente Ionen ist also umso größer, je schneller der Quench vonstatten geht. Alle Messungen des Mangan-Quenches werden in kalziumfreier extrazellulärer Pufferlösung durchgeführt. Auf diese Weise kann der Mn-Ionen-Einstrom direkt als Maß für die Kalziumleitfähigkeit gelten.

Die Fluoreszenz wird am isosbestischen Punkt gemessen, d.h. unabhängig von der Kalziumkonzentration. Die initialen zehn Werte, vor Mn^{2+} -Zugabe, werden dann gemittelt und normalisiert, sodass sie 100% entsprechen. Alle folgenden Werte beziehen sich dann auf diesen Ausgangswert.

Durch die Normalisierung werden die verschiedenen Zellen mit ihren unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten miteinander vergleichbar gemacht.

Der Fluoreszenzverlust kann nun als Quenchrage in % pro Minute ermittelt werden. Dazu werden die Steigungen in der linearen Phase des Quenches als Regressionsgeraden miteinander verglichen. Wird nun ein Kalziumkanal-Blocker appliziert, so müsste sich die Quenchrage, vorausgesetzt der Kanal trägt zum Quench bei, verringern. Die Fluoreszenz bleibt also stärker als bei der Kontrolle. Verringert sich jedoch die Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle, so handelt es sich um einen Kalziumkanal-Aktivator.

2.6 Praktische Durchführung der Messungen

In dieser Arbeit wurden Muskelfasern von WT-Mäusen und mdx-Mäusen mit Hilfe der Mangan-Quench-Technik untersucht. Betrachtet wurde dabei also vor allem die Ca^{2+} -Permeabilität der Muskelfasermembran und deren Beeinflussung durch potentielle Kanal-Blocker.

Die Experimente wurden in einem abgedunkelten Labor bei Raumtemperatur durchgeführt. Der pH-Wert der Lösungen betrug stets 7,3 und die Osmolarität 300 mOsm.

2.6.1 Inkubation der Muskelfasern mit Fura-2/AM

Jede aus dem Inkubator genommene Zellschale wurde zunächst mikroskopisch auf vorhandene Zellen begutachtet. Das Nährmedium wurde dann aus den Petrischalen abgesaugt und die Pufferlösung E1 (siehe Tab. 2.2) mit Fura-2/AM appliziert. Fura-2/AM wurde als 1 mM Stammlösung, aliquotiert in DMSO, bei -20°C gelagert. Für die Inkubation wurden $10\ \mu\text{l}$ der Stammlösung auf 5 ml E1 gegeben um eine Endkonzentration von $2\ \mu\text{M}$ zu erhalten.

Danach verweilten die Kulturen bei Raumtemperatur und abgedunkelt für 45 Minuten mit dem Farbstoff. Nun wurde das Kulturmedium erneut abgesaugt.

Je nach Versuchsaufbau erfolgte eine weitere Kurzinkubation (BTS, ML-9, Thapsigargin) oder die vorsichtige Entnahme des Deckglases mit anschließender Befestigung in der Messkammer. Dafür wurde das Deckglas mit einer Gummidichtung in einem Metallring verschraubt, welcher auf dem Mikroskoptisch fixiert werden konnte. Der Boden des Glases wurde mit einem Zellstofftuch gereinigt und es wurde 1 ml nominell kalziumfreier Pufferlösung E1 (siehe Tab. 2.2) appliziert.

2.6.2 Vorbereitung der Lösungen

Bei den Experimenten wurden drei verschiedene Pufferlösungen verwendet E1, E2 und E3 (Tab. 2.2). E1 wurde dabei ausschließlich zur Vorinkubation mit Fura-2/AM verwendet.

E2 entspricht nominell kalziumfreier Extrazellulärlösung und wurde zu Beginn der Messungen verwendet, um die Fluoreszenz konstant zu halten. E3 ist Extrazellulärlösung mit $1\ \text{mM}\ \text{Mn}^{2+}$, sodass nach Zugabe der Quench mit einer Konzentration von $500\ \mu\text{M}$ begann.

Bestandteile	E1	E2	E3	Tab. 2.2:
NaCl	140 mM	140 mM	140 mM	Die Extrazellulärlösungen
KCl	2,7 mM	2,7 mM	2,7 mM	
CaCl ₂	1,5 mM	0	0	<i>Aufgelistet sind die</i>
MgCl ₂	1 mM	1 mM	1 mM	<i>verschiedenen</i>
MnCl ₂	0	0	1 mM	<i>Lösungsansätze und ihre</i>
Glucose	6 mM	6 mM	6 mM	<i>spezifische</i>
HEPES	12 mM	12 mM	12 mM	<i>Zusammensetzung.</i>

2.6.3 Die Messung

Die Muskelzellen werden nun mit Hilfe des verschiebbaren Objektisches erfasst, nach Möglichkeit mehrere Zellen, sodass sich die Endzahl der gemessenen Zellen erhöht. Danach wird die 40-fache Vergrößerung eingestellt und erneut fokussiert.

Nun kann das Software Programm gestartet werden. Nach neun Schleifen, also 1 Minute und 30 Sekunden (Abb. 3.2), erfolgte standardisiert die Zugabe von E3, sodass der Quench begann. Effektiv enthielt die Lösung während des Quenches also eine Konzentration von 500 $\mu\text{mol Mn}^{2+}$. Um die Auswirkungen der Testsubstanzen auf den Quench zu untersuchen, wurden nach weiteren 90 Sekunden ein Gemisch aus jeweils 0,5 ml E2 und E3 sowie der Chemikalie zugeführt. So konnten die Konzentrationen konstant gehalten werden.

2.7 Geräte und verwendete Chemikalien

2.7.1 Geräte

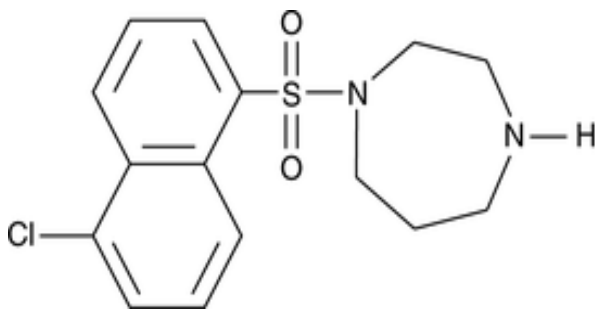
CCD-Kamera (Retiga EXB)	Acal BFi, Grobenzöll
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Gewebekulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CO2 Brutschrank (IG 150)	Jouan, Unterhaching
Mikroskop (Axiovert 200)	Zeiss, Göttingen
Monochromator	Kinetic Imaging Ltd., UK

Rüttelinkubator (TH 15)
Sicherheitswerkbank (Heraeus Herasafe)
AQM advance 6 Software

Edmund Bühler, Hechingen
Thermo Fisher, Dreieich
Kinetic Imaging Ltd., Nottingham, UK

2.7.2 Chemikalien

BTS	Calbiochem (Merck), Darmstadt
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dispase II	Roche, Mannheim
DMEM	Gibco, Grand Island NY (USA)
DMEM/F12	Gibco, Grand Island NY (USA)
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's PBS,	PAA, Pasching (Österreich)
FCS	PAA, Pasching (Österreich)
Fura-2/AM	Invitrogen, Eugene (USA)
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Hepes	Serva, Heidelberg
Horse serum	Gibco, Grand Island NY (USA)
KCl	Carl Roth, Karlsruhe
Kollagenase	Serva, Heidelberg
Matrix	BD Biosciences, Bedford MA (USA)
MgCl ₂	Fluka (Sigma-Aldrich), Steinheim
ML-9	Caymanchem, Ann Arbor MI (USA)



• HCl Abb. 2.3:
ML-9

Abgebildet ist die chemische Strukturformel von ML-9, dem für die Experimente verwendeten TRPC6 Blocker.

MnCl₂

Sigma-Aldrich, Steinheim

NaCl

Pen/Strep

Thapsigargin

Carl Roth, Karlsruhe

Gibco, Grand Island NY (USA)

Calbiochem (Merck), Darmstadt

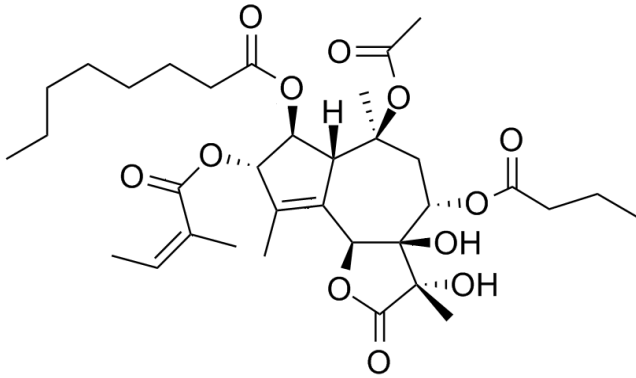


Abb. 2.4:

Strukturformel von Thapsigargin

Abgebildet ist die chemische Strukturformel von Thapsigargin, dem für die Experimente verwendeten SERCA-Inhibitor.

2.8 Statistik

Die Statistiken wurden mit Hilfe der Programme GraphPad Prizm und Sigma Plot erhoben. Während Sigma Plot 10.0 ausschließlich für die grafischen Aufarbeitungen verwendet wurde, kam GraphPad Prizm 4 bei der mathematischen Auswertung zum Einsatz.

Zunächst mussten die zu untersuchenden Werte in Paarwert- und nicht gepaarte Gruppen unterteilt werden. Paarwerte entsprechen in diesem Falle den gleichen Zellen, die vor und nach Zugabe eines Agens verglichen werden sollen. Zum Beispiel werden 7 Zellen auf statistische Unterschiede vor und nach der Manganzugabe untersucht, dies entspricht Paarwerten, da die gleichen Zellen untersucht werden. Sind die Werte dabei normalverteilt, so wird für die Statistik der Paired-T-Test verwendet. Sind sie nicht normalverteilt, wird der Wilcoxon-Matched-Pairs-Test verwendet.

Nicht gepaarte Werte sind zum Beispiel eine Gruppe von 6 Zellen, der Mangan zugeführt wird, und eine Gruppe von 8 Zellen, denen Kalzium zugegeben wird. Beide Gruppen werden nach der Applikation des jeweiligen Agens miteinander verglichen. Da hierbei nicht die gleichen Zellen miteinander verglichen werden, wird der Unpaired-T-Test verwendet, sofern eine Normalverteilung vorliegt. Ist dies nicht der Fall, wird der Mann-Whitney-Test verwendet. Das Konfidenzintervall betrug für alle Testformen immer 95%. Alle Datensätze einer Versuchsgruppe wurden mit Hilfe des KS-Normality-Tests auf eine gaußsche Normalverteilung untersucht.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Mangan-Quench-Technik die Membranleitfähigkeit von Wildtyp und mdx-Mausskelettmuskelzellen für divalente Kationen untersucht. Das Ziel war dabei die Beurteilung einer möglichen Rolle des TRPC6 Kanals für die Kalziumpermeabilität des Sarkolemms. Mit Hilfe von ML-9, einem TRPC6-Blocker, sollte die Kanalfunktion sowohl in Ruhe als auch nach Kalziumspeicher-Entleerung durch Thapsigargin untersucht werden.

3.1 Einführende Untersuchungen

3.1.1 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit kamen ausschließlich Muskelfasern von Kontroll- und mdx-Mäusen zum Einsatz. Sowohl die Kontroll- als auch die mdx-Fasern wurden am ersten, spätestens jedoch am zweiten Tag, nach der Präparation verbraucht.

3.1.2 Imaging

Zur exemplarischen visuellen Darstellung des Mangan-Quenches wurden Messungen mit dem Imaging-System durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine über die ganze Muskelfaser gleichmäßig verteilte Fluoreszenzabnahme sowohl in WT- als auch mdx-Skelettmuskelfasern.

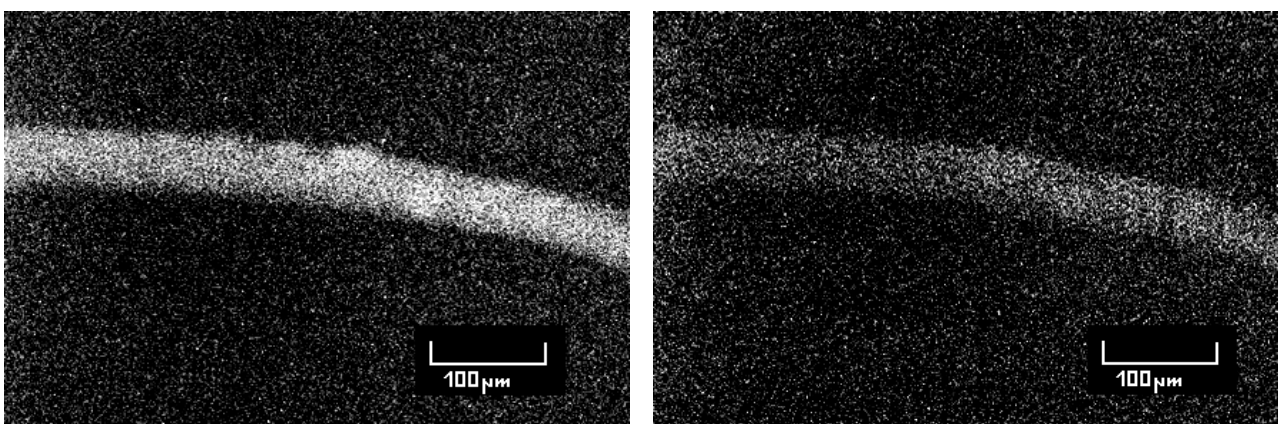


Abb. 3.1:

Die Abnahme der Fluoreszenz in einer WT-Muskelfaser

Zu sehen sind zwei Bilder der gleichen Wildtyp Muskelzelle (40x Vergrößerung) vor Beginn (links) der Mn^{2+} -Zugabe und 20 Minuten danach (rechts).

Die Auswertungen beziehen sich immer auf die Phase des linearen Abfalls der Fluoreszenz. Der Zeitraum beträgt ca. 10 Minuten nach dem Start der Imaging Messungen. Danach näherte sich die Fluoreszenz asymptotisch einem Basalwert von etwa 50% des Ausgangswertes.

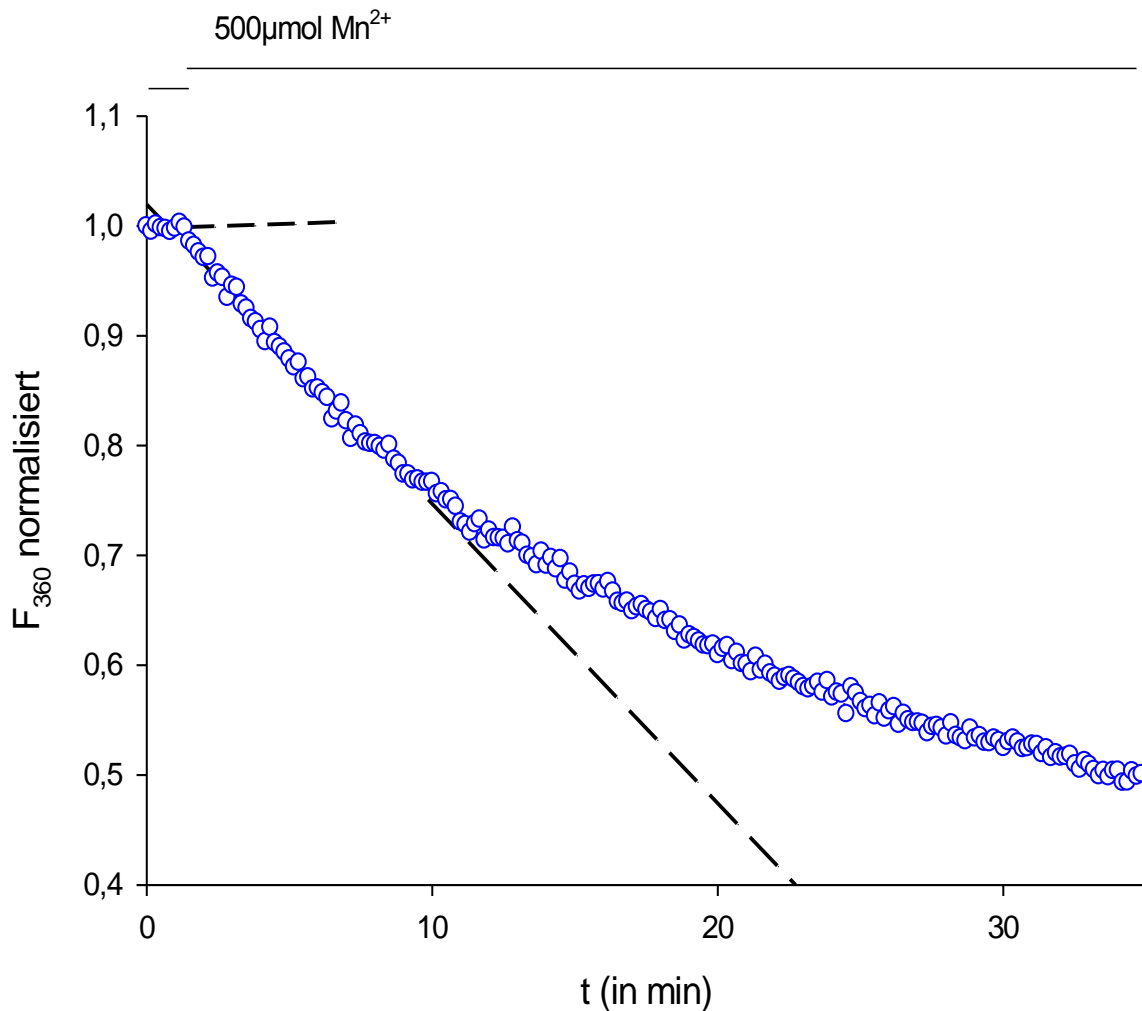


Abb. 3.2:

Abklingen der Fura-2 Fluoreszenz in einer WT-Muskelzelle nach Applikation von Mn²⁺.

Aufgetragen ist die normalisierte Intensität der Fura-2 Fluoreszenz gegen die Zeit. Zu sehen ist ein kleiner Abschnitt ohne Abfall des Fluoreszenzsignals vor der Zugabe des Mn²⁺. Danach folgt bis ca. zur 10 Minute ein linearer Abfall des Signals. Dies ist der Zeitraum der in den Experimenten zur Auswertung herangezogen wurde. Danach nähert sich der Graph asymptotisch einem Fluoreszenzwert von etwa 50% an. Mit gestrichelten Linien sind die linearen Regressionen aller drei Abschnitte abgebildet.

3.2 Versuche

3.2.1 Vergleich der Quenchraten in Wildtyp- und mdx-Skelettmuskelfasern

Bei diesem Versuchsaufbau wurde wie unter 2.6.3. verfahren, jedoch ohne zusätzliche Applikation von Chemikalien nach 180 Sekunden. Somit wurde der Zeitraum von der Manganzugabe (1:30 min) bis zum Auslaufen der linearen Phase nach 10 Minuten untersucht. Die Quenchraten als Maß für den Fluoreszenzverlust betragen bei den Kontrollfasern $3,0 \text{ %/min} \pm 2,3 \text{ %/min}$ ($n=36$), während die mdx-Fasern einen Abfall der Quenchrates von $3,5 \text{ %/min} \pm 2,3 \text{ %/min}$ ($n=34$) zeigten. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen stellte sich als nicht signifikant heraus. Allerdings liegt der p-Wert des two-tailed Mann-Whitney-Test relativ nahe am Signifikanzniveau ($p=0,11$).

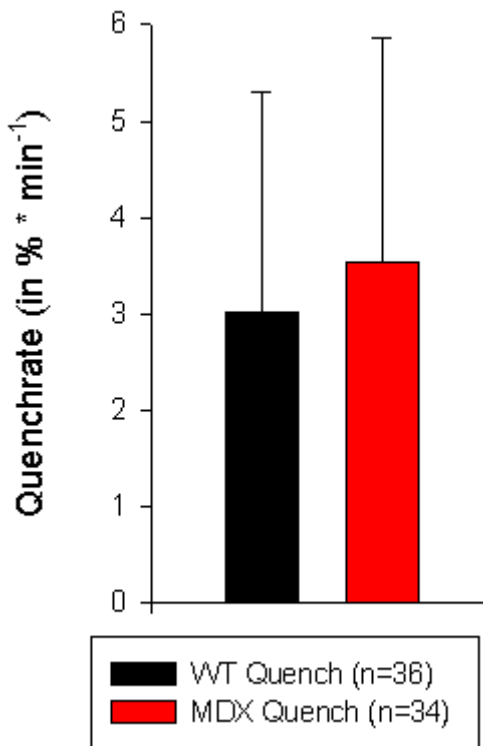


Abb. 3.3:

Vergleich der basalen Quenchraten in Wildtyp- und mdx-Skelettmuskelzellen.

Angegeben sind die mittleren Quenchraten in %/min mit den Standardabweichungen der 36 Wildtypfasern (schwarz) und der 34 mdx-Fasern (rot) zwischen 1:30 und der 10. Minute.

Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant, Mann-Whitney-Test (keine Gauß'sche Normalverteilung), $p > 0,05$.

3.2.2 Vergleich der Quenchraten mit dem aktivierten SOCE

Für dieses Experiment wurden die Fasern nach ihrer 45 minütigen Inkubation mit Fura-2/AM des Weiteren mit BTS und Thapsigargin inkubiert.

BTS ($30 \mu\text{mol}$) wurde für 10 Minuten mit E2 Medium appliziert und die Zellen weiterhin im Dunkeln gelagert, um eine Abnahme der Fluoreszenz durch Lichtexposition zu vermeiden.

Danach erfolgte eine fünfminütige Kurzinkubation mit Thapsigargin (1 μ mol) ebenfalls mit E2 Medium und in Dunkelheit. Der weitere Ablauf erfolgte wie unter 2.6.3. bereits erwähnt, jedoch ebenfalls ohne zusätzliche Applikation von weiteren Chemikalien nach 180 Sekunden.

Vergleich der Quenchraten mit dem aktivierten SOCE in WT-Fasern

Bei diesem Experiment betragen die Quenchraten bei den Kontrollfasern 3,0 %/min \pm 2,3 %/min (n=36), während die mit Thapsigargin vorinkubierten Zellen eine beschleunigte Fluoreszenzabnahme von 6,9 %/min \pm 4,2 %/min (n=20) aufwiesen. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen stellte sich als hoch signifikant heraus.

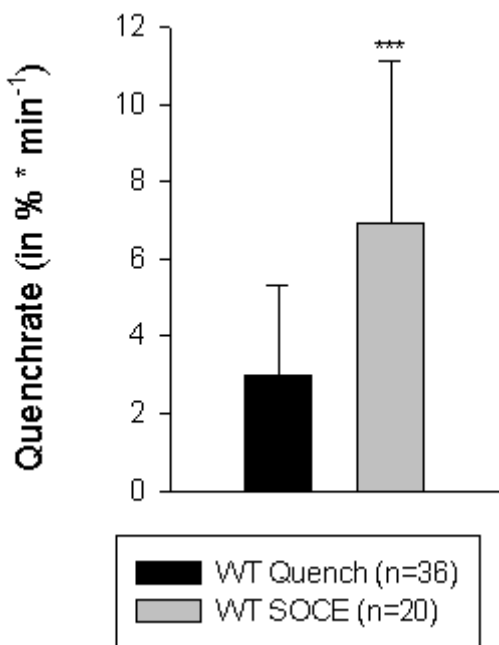


Abb. 3.4:

Vergleich des basalen Quenches gegen den SOCE in Wildtyp-Skelettmuskelzellen.

Angegeben sind die mittleren Quenchraten in %/min (1:30-10 min.) mit den Standardabweichungen der 36 Kontrollfasern (schwarz) und der 20 mit Thapsigargin vorinkubierten Fasern (grau).

Der Unterschied ist statistisch hoch signifikant, Mann-Whitney-Test (Werte nicht normalverteilt), $p < 0,001$.

Vergleich der Quenchraten mit dem aktivierten SOCE in mdx-Fasern

Auch für die mdx-Fasern konnte der SOCE durch Thapsigarginapplikation sichtbar gemacht werden. Die Quenchraten der mdx-Fasern waren mit 3,5 %/min \pm 2,3 %/min (n=34) signifikant niedriger als die mit Thapsigargin vorinkubierten mdx-Zellen mit einem Abfall der Quenchraten von 6,5 %/min \pm 3,2 %/min (n=23).

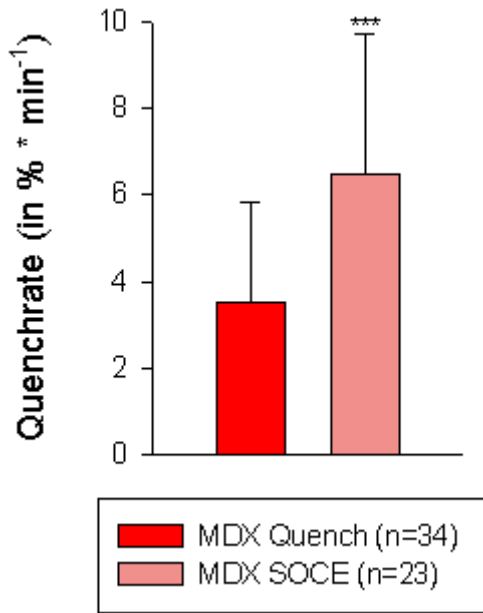


Abb. 3.5:

Vergleich des basalen Quenches gegen den SOCE in mdx-Skelettmuskelzellen.

Angegeben sind die mittleren Quenchrates in %/min (1:30-10 Min.) mit den Standardabweichungen der 34 mdx-Fasern (rot) und der 23 mit Thapsigargin vorinkubierten mdx-Fasern (altrosa). Der Unterschied ist statistisch hoch signifikant, Unpaired-T-Test (Werte nach KS-Normality-Test normalverteilt), $p < 0,001$.

3.2.3 Vergleich der SOCEs in Wildtyp- und mdx-Skelettmuskelfasern.

Der Fluoreszenzverlust bei aktiviertem SOCE betrug in den Wildtypskelettmuskelfasern $6,9 \text{ %/min} \pm 4,2 \text{ %/min}$ bei $n=20$. Die mdx-Fasern zeigten dagegen einen Abfall der Fluoreszenz von $6,5 \text{ %/min} \pm 3,2 \text{ %/min}$ ($n=23$). Es ergab sich statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

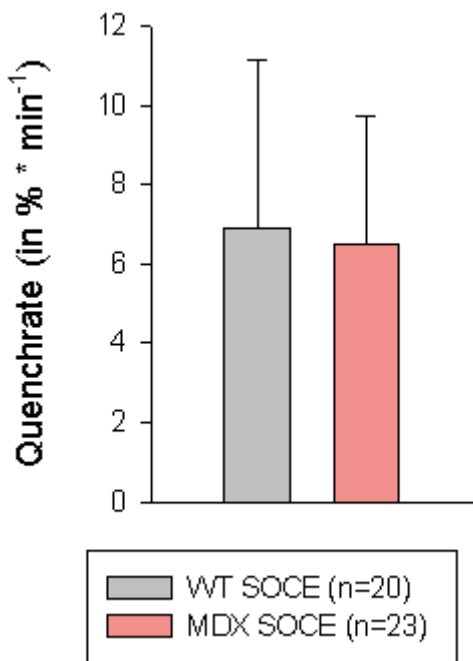


Abb. 3.6:

Vergleich der SOCEs in Wildtyp- und mdx-Skelettmuskelzellen.

Angegeben sind die mittleren Fluoreszenzabnahmen in %/min (1:30-10 Min.) mit den Standardabweichungen der 20 Wildtyp- (grau) und den 23 mdx-Fasern (altrosa). Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant, Mann-Whitney-Test, $p = 0,9903$.

3.2.4 Der Einfluss des TRPC6-Blockers ML-9 auf den Kalziumeinstrom in Skelettmuskelfasern

Um die Auswirkungen des TRPC6-Blockers ML-9 auf den Kalziumeinstrom der Plasmamembran messen zu können, muss die Versuchsanordnung leicht modifiziert werden. Nach der Applikation der manganhaltigen Lösung E3 (90 Sekunden nach Beginn der Messung) wird nun weitere 90 Sekunden später das ML-9 dazu gegeben (0,5 ml E2 + 0,5 ml E3). Die Abb. 3.6 verdeutlicht dies nochmals schematisch.

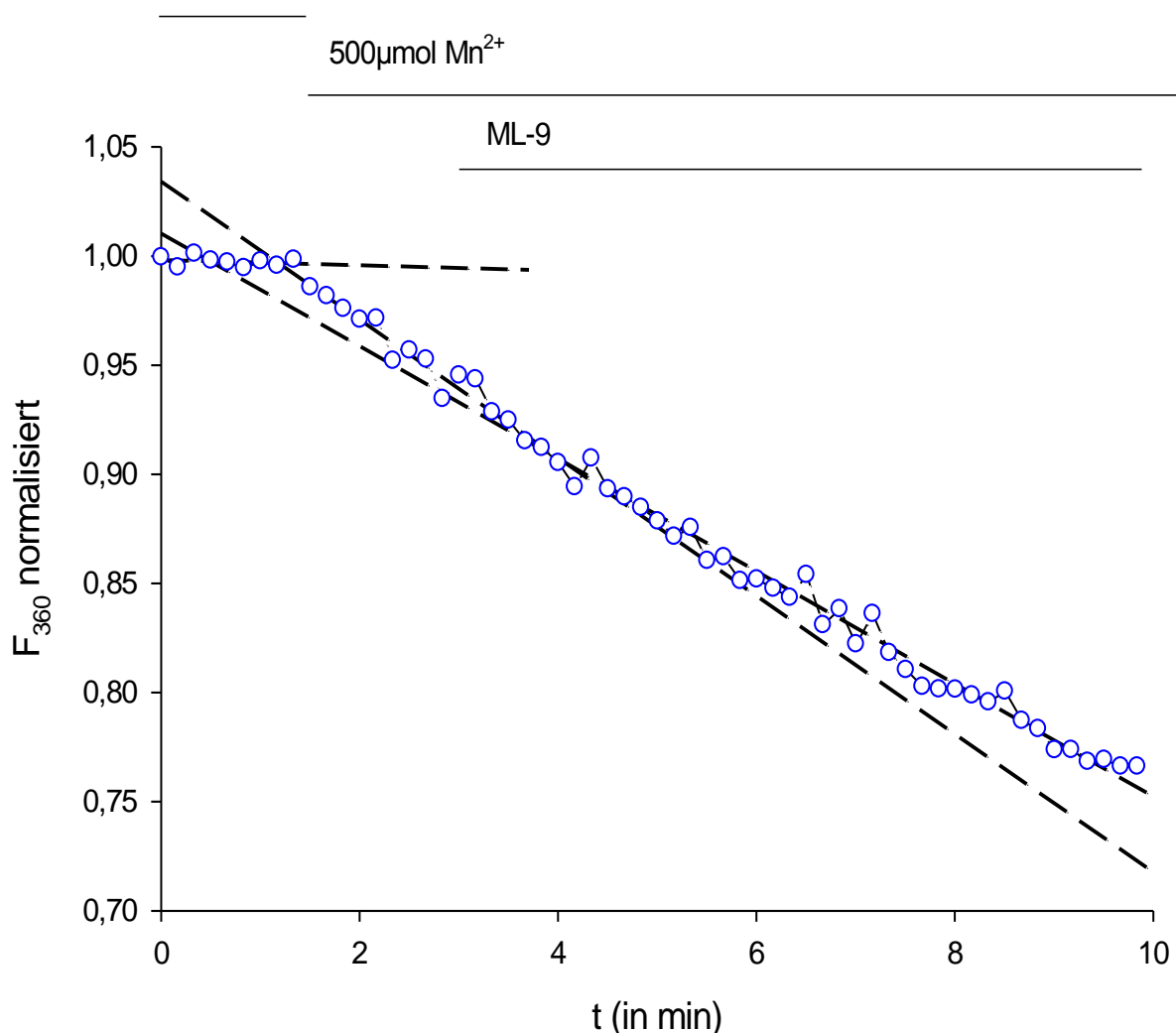


Abb. 3.7:
Wirkung von ML-9 auf die Fluoreszenzintensität von Fura-2 in einer Muskelfaser

Abgebildet ist die normalisierte Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit in Minuten. Nach 90 Sekunden erfolgte die Zugabe der manganhaltigen Lösung E3, wie bei den vorhergegangenen Messungen. Nach 3 Minuten wird zusätzlich ML-9 appliziert. In der Abbildung werden die linearen Regressionen vor und nach ML-9-Zugabe gezeigt. Diese werden zur Auswertung des Einflusses von ML-9 auf die Quenchraten herangezogen.

3.2.4.1 Der Einfluss des ML-9 auf den basalen Quench in WT-Fasern

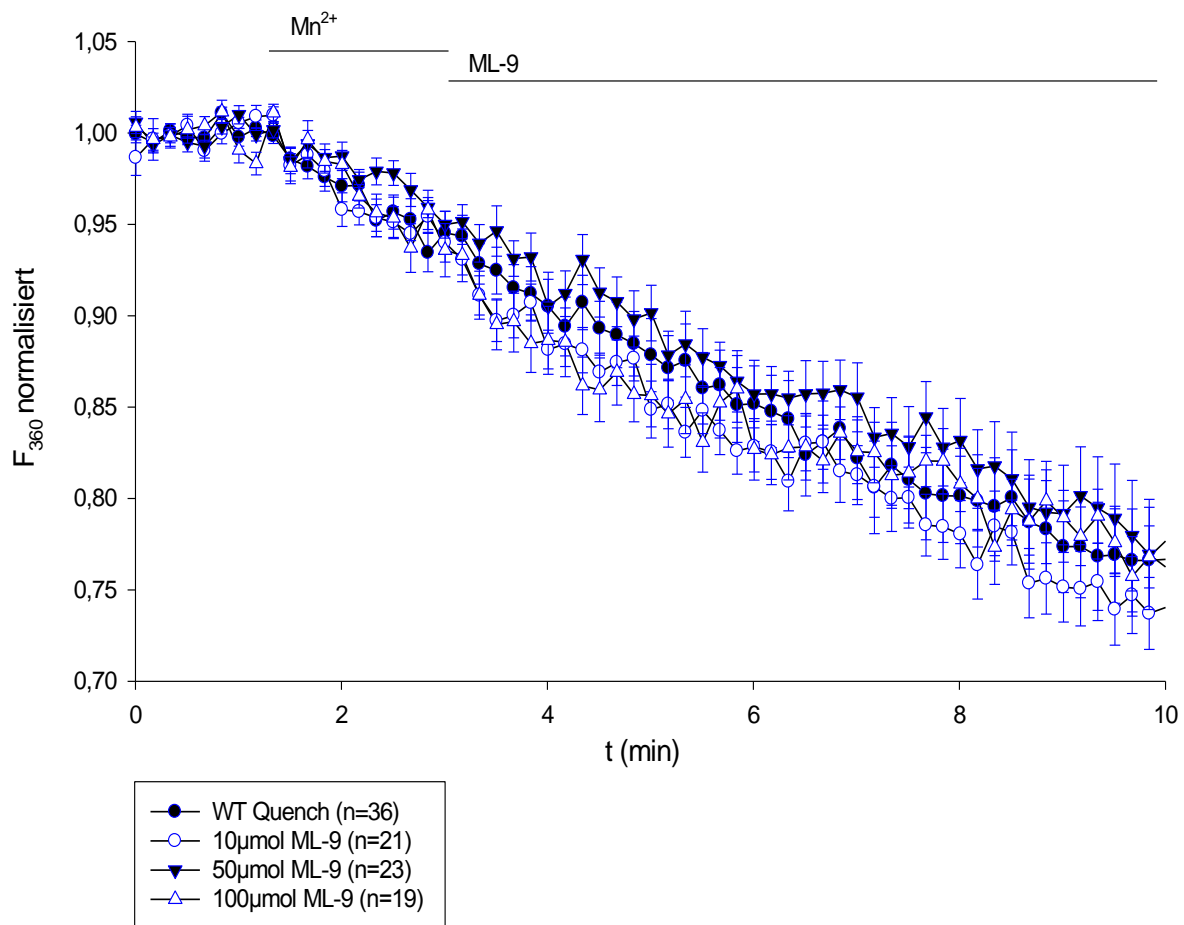


Abb. 3.8:

Die Wildtyp-Quench-Kurven unter ML-9 Einfluss

Zu sehen sind vier WT-Quench-Kurven. Der bekannte WT-Kontroll-Quench [schwarzer Kreis, $n=36$] bei dem keine Zugabe von ML-9 erfolgte, sowie 3 Kurven mit verschiedenen Konzentrationen von ML-9 (10 μ mol [weißer Kreis, $n=21$], 50 μ mol [schwarzes Dreieck, $n=23$], 100 μ mol [weißes Dreieck, $n=19$]), welches jeweils nach 3 Minuten appliziert wurde. Der Versuchsaufbau erfolgte also wie zuvor in 3.2.4. schematisch dargestellt.

Die Fluoreszenzabnahme nach Zugabe von ML-9 ist für keine der verschiedenen Konzentrationen signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Fluoreszenzverlust vor der Zugabe von ML-9 (siehe Abb. 3.9.-3.12.). Auch der Quervergleich zwischen den verschiedenen Konzentrationen ergibt keinen signifikanten Unterschied im Quenchverhalten.

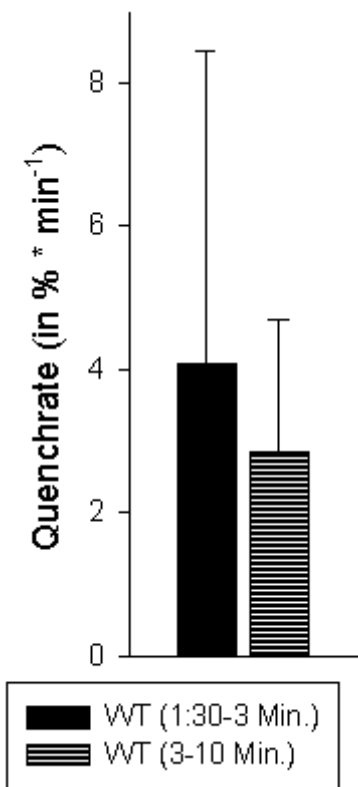


Abb. 3.9:

Fura-2-Quench von Wildtyp-Muskelfasern in 2 Zeitabschnitten nach Mn²⁺-Zugabe (schwarz).

Angegeben sind die mittleren Quenchrates vor der 3. Minute (flächig) mit 4,1 %/min ± 4,3 %/min und nach der 3. Minute (schraffiert) mit 2,8 %/min ± 1,8 %/min, jeweils mit der entsprechenden Standardabweichung. Bei einer Versuchszahl von n=36 ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied, Wilcoxon-Matched-Pairs-Test, $p > 0,05$.

Abb. 3.10:

Fura-2-Quench von Wildtyp-Muskelfasern in 2 Zeitabschnitten vor und nach Zugabe von 10 µmol ML-9 (dunkelblau).

Angegeben sind die mittleren Quenchrates vor der Zugabe von ML-9 (flächig) mit 4,0 %/min ± 2,9 %/min und nach der ML-9 Applikation (schraffiert) mit 3,2 %/min ± 1,1 %/min, jeweils mit der entsprechenden Standardabweichung. Bei einer Versuchszahl von n=21 ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied, Paired-T-Test, $p > 0,05$.

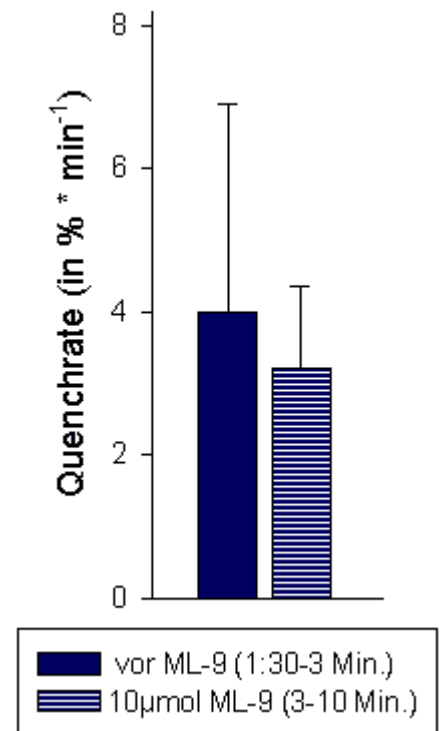
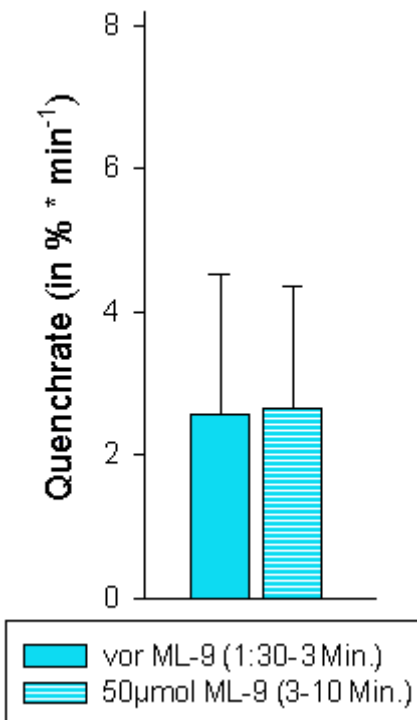


Abb. 3.11:

Fura-2-Quench von Wildtyp-Muskelfasern in 2 Zeitabschnitten vor und nach Zugabe von 50 µmol ML-9 (türkis).

Angegeben sind die mittleren Quenchrates vor der Zugabe von ML-9 (flächig) mit 2,6 %/min ± 2,0 %/min und nach der ML-9 Applikation (schraffiert) mit 2,7 %/min ± 1,7 %/min, jeweils mit der Standardabweichung. Bei einer Versuchszahl von n=23 ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied, Paired-T-Test, $p > 0,05$.



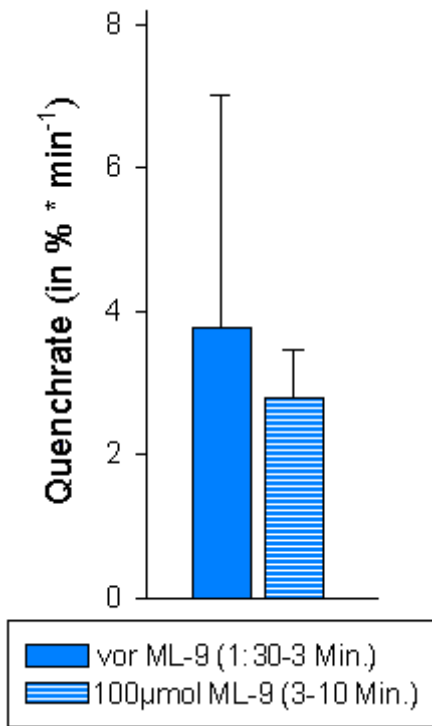


Abb. 3.12:

Fura-2-Quench von Wildtyp-Muskelfasern in 2 Zeitabschnitten vor und nach Zugabe von 100µmol ML-9 (hellblau).

Angegeben sind die mittleren Quenchraten vor der Zugabe von ML-9 (flächig) mit 3,8 %/min ± 3,2 %/min und nach der ML-9 Applikation (schraffiert) mit 2,8 %/min ± 0,7 %/min, jeweils mit der Standardabweichung. Bei einer Versuchszahl von n=19 ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied, Paired-T-Test, p > 0,05.

3.2.4.2 Der Einfluss des ML-9 auf den SOCE in WT-Fasern

In diesen Versuchen wurden die Zellen zunächst wie unter 3.2.2. mit Thapsigargin vorinkubiert. Auch hier musste wegen der starken kontraktilen Aktivität, durch die Entleerung des sarkoplasmatischen Retikulums, BTS hinzu gegeben werden. Der weitere Versuchsablauf entspricht dem der anderen ML-9 Versuche.

Der SOCE-Quench der WT-Fasern vor der ML-9-Applikation war mit 3,6 %/min ± 3,0 %/min (n=26) nicht signifikant verändert im Vergleich zum Zeitpunkt nach ML-9-Zugabe mit einem Abfall der Quenchraten von 4,7 %/min ± 2,3 %/min (n=26).

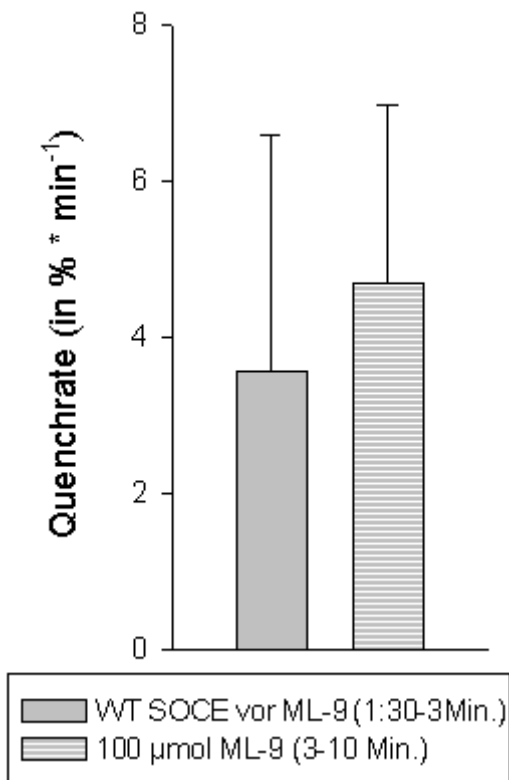


Abb. 3.13:

Vergleich des WT-SOCE (n=26) vor und nach der Zugabe von 100 µmol ML-9 (grau).

Abgebildet sind die mittleren Quenchraten in % / min vor (flächig) und nach der Zugabe von ML-9 (schraffiert) mit den Standardabweichungen.

Die Werte sind normalverteilt und nicht statistisch signifikant unterschiedlich, Paired-T-Test, p > 0,05.

Auch für diesen Versuchsaufbau wurde der Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Quenchrates untersucht, um etwaige Beeinflussungen der Quenchrates durch DMSO selber zu überprüfen.

Der SOCE-Quench der WT-Fasern mit ML-9-Applikation war mit $4,7 \text{ %/min} \pm 2,3 \text{ %/min}$ ($n=26$) nicht signifikant verändert im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem Abfall der Quenchrates von $5,8 \text{ %/min} \pm 3,9 \text{ %/min}$ ($n=20$).

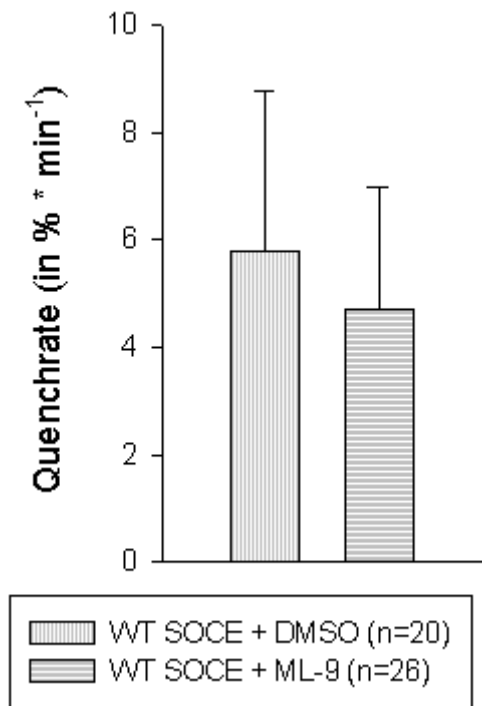


Abb. 3.14:

Vergleich des WT-SOCE (grau) nach Zugabe von DMSO und ML-9:

Zu sehen sind die mittleren Quenchrates in % / min nach der Zugabe von ML-9 (horizontal schraffiert, $n=26$) beziehungsweise der dazugehörigen Kontrolle mit DMSO-Zugabe (vertikal schraffiert, $n=20$) mit der jeweiligen Standardabweichung.

Die Werte sind normalverteilt und nicht statistisch signifikant unterschiedlich, Unpaired-T-Test, $p > 0,05$.

In einem weiteren Versuch wurde die Anordnung des vorangegangenen Aufbaus umgekehrt. Aus der Überlegung heraus, dass ML-9 eine längere Einwirkzeit benötigen könnte, wurde die Applikation der Chemikalien exakt umgedreht. Die Zellen wurden jetzt mit ML-9 beziehungsweise DMSO (Kontrolle) inkubiert und nach 3 Minuten des Quench-Experimentes wurde Thapsigargin auf die Muskelzellen appliziert.

Die Quenchrates der WT-Fasern mit ML-9-Vorinkubation waren mit $3,1 \text{ %/min} \pm 1,5 \text{ %/min}$ ($n=18$) nicht signifikant verändert im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem Abfall der Quenchrates von $3,1 \text{ %/min} \pm 1,2 \text{ %/min}$ ($n=21$). Die Quenchrates lagen damit, trotz Thapsigarginapplikation im Bereich des normalen WT-Quenches ($2,8 \text{ %/min} \pm 1,8 \text{ %/min}$).

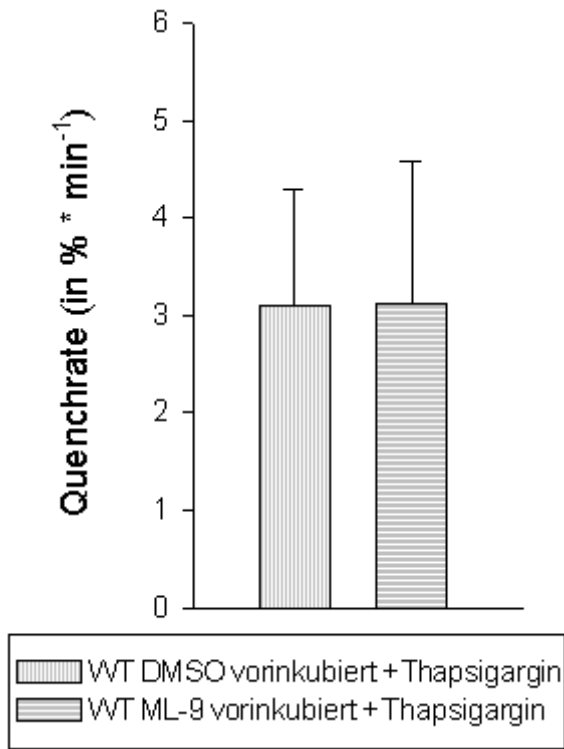


Abb. 3.15:

Vergleich von ML-9 bzw. DMSO vorinkubierten Wildtyp-Zellen nach Thapsigarginzugabe

Zu sehen sind die mittleren Quenchraten in % / min nach Vorinkubation mit DMSO (vertikal schraffiert, n=21) beziehungsweise mit ML-9 (horizontal schraffiert, n=19) und die jeweiligen Standardabweichungen. Der Vergleich bezieht sich auf den Zeitraum nach der Thapsigarginapplikation. Die Werte sind normalverteilt und nicht statistisch signifikant unterschiedlich, Unpaired-T-Test, $p = 0,9803$.

3.2.4.3 Einfluss des ML-9 auf den basalen Quench in mdx-Fasern

Auf Grund der ursprünglichen Annahme, dass mdx-Fasern einen basal erhöhten Kalziumeinstrom über die Plasmamembran gegenüber den WT-Fasern aufweisen, wurden die gleichen Experimente wie unter 3.2.4.1 für mdx-Skelettmuskelzellen wiederholt. Die Quenchraten vor ML-9 Zugabe unterscheidet sich nicht signifikant von der Quenchraten nach ML-9 Zugabe.

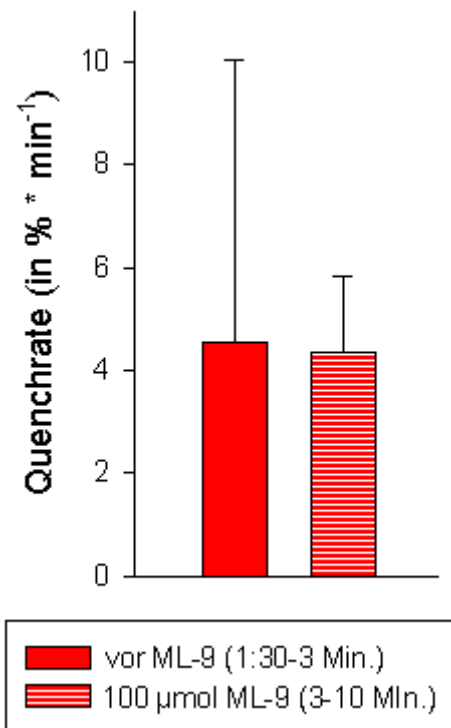


Abb. 3.16:

Vergleich der Quenchraten in mdx-Skelettmuskelfasern vor und nach der Zugabe von 100 μmol ML-9 (rot).

Angegeben sind die mittleren Quenchraten vor der Zugabe von ML-9 (flächig) mit 4,5 %/min ± 5,5 %/min und nach der ML-9 Applikation (schraffiert) mit 4,4 %/min ± 1,5 %/min und die zugehörige Standardabweichung. Bei einer Versuchszahl von n=15 ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied, Paired-T-Test, $p > 0,05$

3.2.4.4 Einfluss auf den SOCE in mdx-Fasern

Wie bei den WT-Fasern wurde der Einfluss des TRPC6-Blocks auf den SOCE untersucht. Zunächst erfolgte eine 10 Minuten Inkubation mit BTS, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation mit Thapsigargin. Dann wurde der Quench nach 90 Sekunden gestartet und nach 3 Minuten erfolgte standardisiert die Zugabe von ML-9 bzw. der Kontrolle (DMSO).

Die Quenchraten der Kontrollen waren mit $5,9 \text{ %/min} \pm 2,3 \text{ %/min}$ ($n=12$) nicht signifikant höher als die ML-9 Zellen mit einem Abfall der Quenchraten von $6,7 \text{ %/min} \pm 3,6 \text{ %/min}$ ($n=13$).

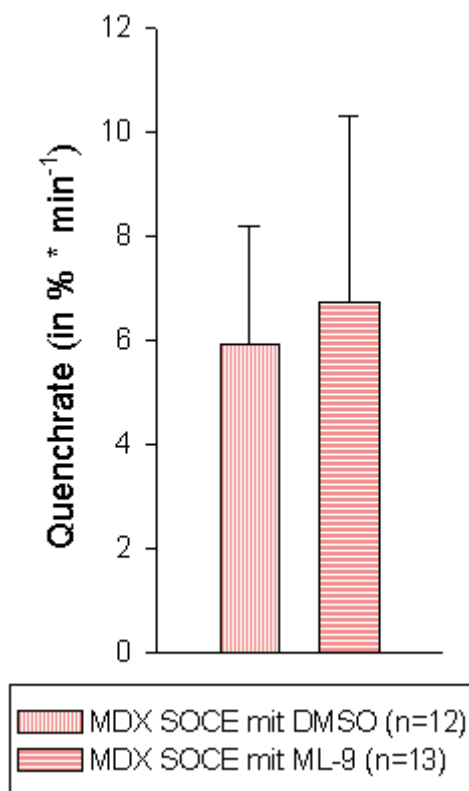


Abb. 3.17:

Vergleich des mdx-SOCE (altrosa) nach Zugabe von DMSO und ML-9:

Zu sehen sind die mittleren Quenchraten in % / min nach der Zugabe von ML-9 (horizontal schraffiert, $n=13$) beziehungsweise der dazugehörigen Kontrolle mit DMSO-Zugabe (vertikal schraffiert, $n=12$) und ihre jeweiligen Standardabweichungen.

Die Werte sind normalverteilt und nicht statistisch signifikant unterschiedlich, Unpaired-T-Test, $p > 0,05$.

Es erfolgte erneut die Umkehrung des Versuches, sodass die Zellen nach der BTS-Inkubation (10 Min.) zunächst mit ML-9 bzw. DMSO nachinkubiert wurden (5 Minuten). Es erfolgte der normale Quench-Ablauf mit Zugabe von Thapsigargin nach 3 Minuten.

Die Quenchraten der WT-Fasern mit ML-9-Vorinkubation waren mit $4,9 \text{ %/min} \pm 2,9 \text{ %/min}$ ($n=9$) nicht signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem Abfall der Quenchraten von $3,7 \text{ %/min} \pm 1,3 \text{ %/min}$ ($n=17$). Hier zeigten sich analog zum Wildtypversuch Werte im Bereich der basalen mdx-Quenches.

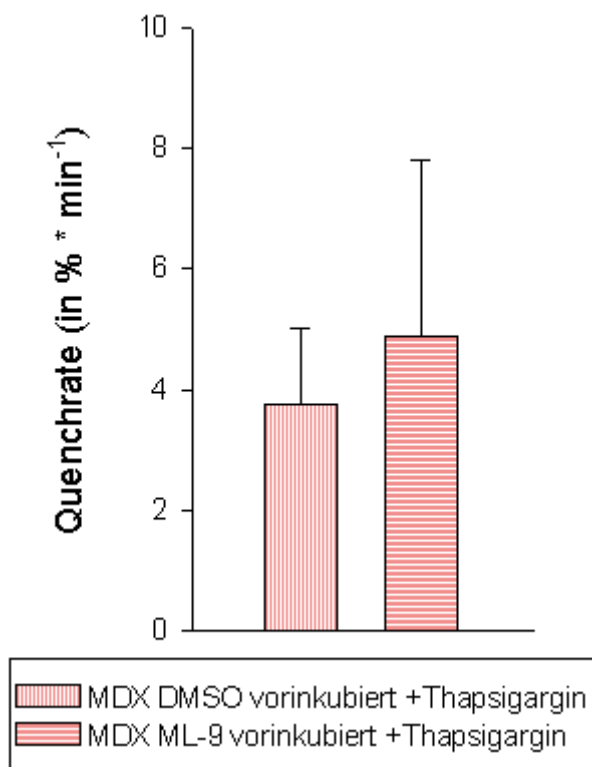


Abb. 3.18:

Vergleich von DMSO bzw. ML-9 vorinkubierten mdx-Skelettmuskelzellen nach Thapsigarginzugabe

Zu sehen sind die mittleren Quenchrates in % / min nach Vorinkubation mit DMSO (vertikal schraffiert, n=17) beziehungsweise mit ML-9 (horizontal schraffiert, n=9) und ihre jeweiligen Standardabweichungen. Der Vergleich bezieht sich auf den Zeitraum nach der Thapsigarginapplikation. Die Werte sind normalverteilt und nicht statistisch signifikant unterschiedlich, Unpaired-T-Test, $p > 0,05$.

3.2.5 Kontrollmessungen

Weitere Kontrollmessungen wurden ebenfalls durchgeführt. So gab es Versuche die den Einfluss des BTS untersuchten, wobei keine statistisch signifikante Einflussnahme beobachtet werden konnte.

Auch der Einfluss des Geschlechtes der Maus auf die Ergebnisse wurde untersucht. Auch hier fanden sich keine Unterschiede bezüglich der Quenchrage.

Ebenso wurde das Experiment ohne Zugabe von Mangan durchgeführt wobei sich eine konstant bleibende Fluoreszenz ergab (siehe Abb. 3.19).

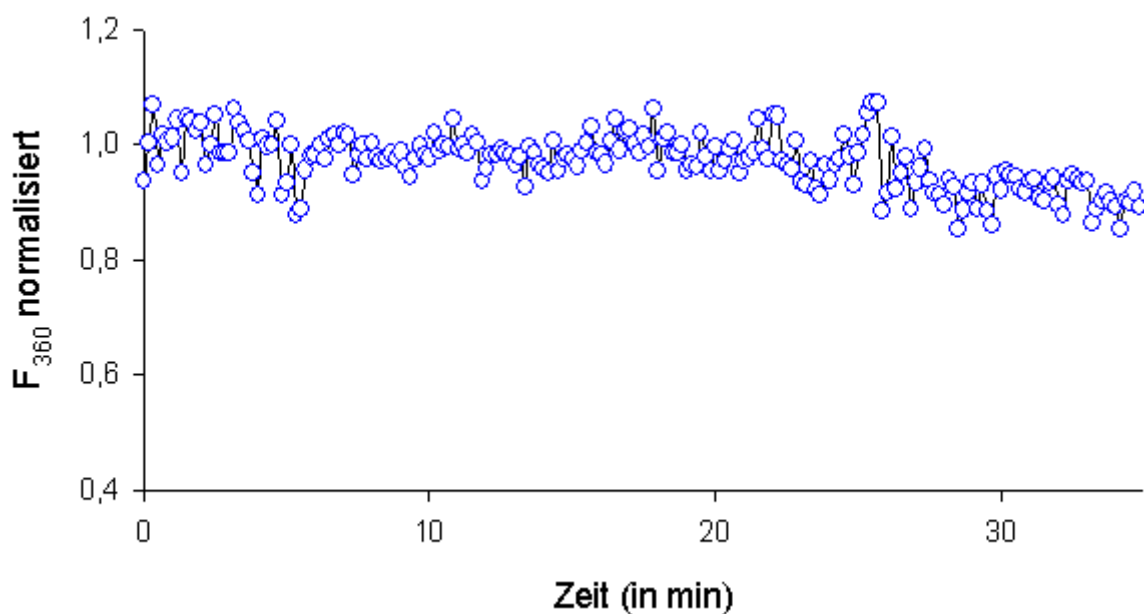


Abb. 3.19:

Fluoreszenzkontrolle

Abgebildet ist die normalisierte Fluoreszenz einer einzelnen Skelettmuskelfaser. Als Kontrolle wurde im Gegensatz zu den Experimenten keine extrazelluläre Flüssigkeit mit Mangan zugeführt. Die Fluoreszenz bleibt über die gesamte Laufzeit der Schleifenmessung konstant. Der Abfall der Intensität während der Experimente wird somit durch den Quench verursacht und nicht durch den Photobleaching-Effekt.

Da ML-9 in kristalliner Form angeliefert wurde, muss es durch ein Lösungsmittel (DMSO) verflüssigt werden. Natürlich könnte auch das DMSO selber einen Einfluss auf die Quenchraten haben, deshalb wurden weitere Kontrollexperimente durchgeführt um dies zu überprüfen. Zum Vergleich werden die bereits bekannten Quenchraten aus 3.2.4.1 herangezogen. Sowohl der WT-Quench (n=36, schwarz) mit $2,8 \text{ %/min} \pm 1,8 \text{ %/min}$, die 10 μmol ML-9-Kontrolle (n=21, dunkelblau) mit $3,2 \text{ %/min} \pm 1,1 \text{ %/min}$, die 50 μmol ML-9-Kontrolle (n=23, türkis) mit $2,7 \text{ %/min} \pm 1,7 \text{ %/min}$ als auch die 100 μmol ML-9-Kontrolle (n=19, hellblau) mit $2,8 \text{ %/min} \pm 0,7 \text{ %/min}$ zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle mit Zugabe von DMSO nach der 3. Minute.

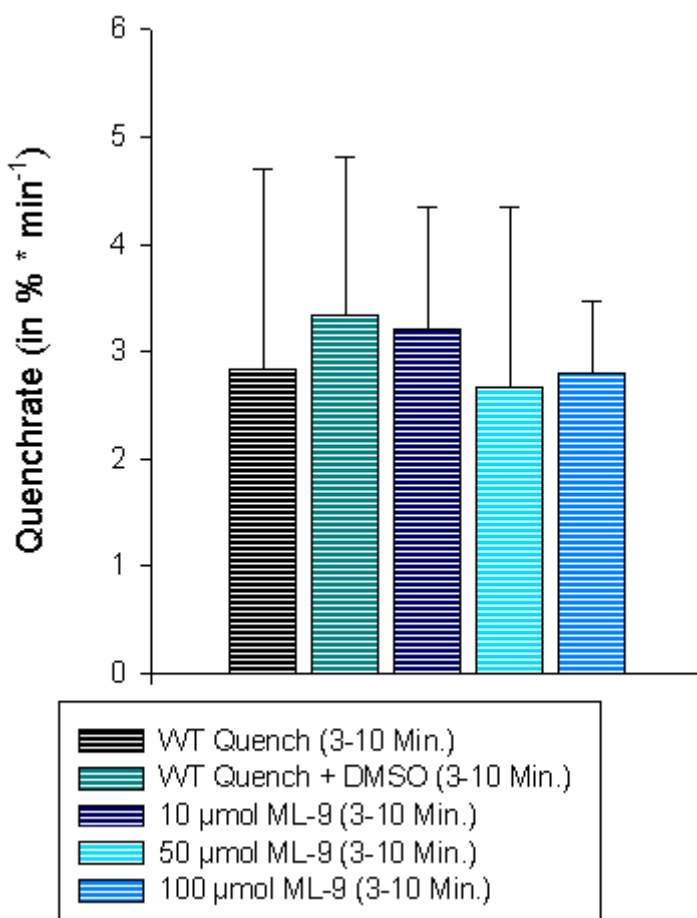


Abb. 3.20:

Vergleich der Quenchraten in Wildtyp-Muskelzellen nach der 3. Minute.

Zu sehen sind die mittleren Quenchraten nach der 3. Min. mit der jeweiligen Standardabweichung. Keiner der Werte ist im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (n=23, blaugrün) mit $3,4 \text{ %/min} \pm 1,5 \text{ %/min}$ statistisch signifikant unterschiedlich, Unpaired-T-Test / Mann-Whitney-Test, $p > 0,05$.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen an Muskelfasern von Kontroll- und mdx-Mäusen durchgeführt. Dabei wurde der Einstrom divalenter Kationen unter Ruhebedingungen und nach Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher untersucht. Zur Darstellung des Kationeneinstromes wurde die Mangan-Quench-Technik eingesetzt.

4.1. Stärken und Grenzen der gewählten Methode

In dieser Arbeit wurden Skelettmuskelfasern von normalen und mdx-Mäusen verwendet. Im Gegensatz zu Myotuben, welche in zahlreichen anderen Arbeitsgruppen eingesetzt werden, stellen Muskelfasern einen höheren Differenzierungsgrad des Skelettmuskels dar und geben somit die Situation im Organismus realitätsnaher wieder.

Jedoch haften die Fasern auf den beschichteten Glasplatten nicht so gut wie Myotuben, sodass während der Inkubation und den Messungen immer gewisse Verluste an Fasern in Kauf genommen werden mussten. Myotuben hingegen, die sich nach mehrtägiger Inkubation aus ausgesäten Myoblasten oder Satellitenzellen in der Zellkultur entwickeln, lösen sich seltener ab und können in größerer Anzahl einer Messung zugeführt werden.

Fura-2 kann in Abhängigkeit von Temperatur und Verweildauer im Zytoplasma kompartmentalisieren. Das heißt es kann in andere Zellorganellen vordringen und somit in verminderter Konzentration im Zytoplasma vorliegen. Dies hat wiederum einen Einfluss auf die gemessene Kalziumkonzentration (Hopf et al., 1996). Unser Arbeitsraum besitzt eine Raumlüftung. Dennoch unterliegt er im Sommer tageszeitlichen Temperaturschwankungen. Temperaturen wie bei Hopf et al. von 37°C wurden jedoch nicht erreicht. Ein Einfluss auf die Messungen kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Wir betrachten dies jedoch als unwahrscheinlich.

Je nach Kalibrierung können quantitative (in vivo Kalibrierung) und semiquantitative (in vitro Kalibrierungen) Messungen durchgeführt werden. Uto et al. warnen vor einer zu strengen Auslegung der quantitativen Messungen an Einzelzellen, da beispielsweise die optischen Linsen eines Mikroskops die UV-Anregungsspektren verändern können. Befinden sich zu dem Proteine in den verwendeten Lösungen, kann sich ein veränderter K_d -Wert für die Messgleichung ergeben. Die gemessenen bzw. errechneten Werte können deshalb von den absoluten Werten abweichen (Uto, Arai und Ogawa 1991). An unserem Messplatz wurden

keine in vitro Kalibrierungen vorgenommen, sodass von Uto, Arai und Ogawa geäußerte Bedenken vernachlässigt werden können.

Der Messplatz erlaubte meist nur die Messung einer einzelnen Zelle pro Deckglas, sodass ein repräsentativer Überblick über die Gesamtheit der Muskelfasern des M. interosseus eingeschränkt ist.

Mit dem Messaufbau konnten auch keine Langzeitmessungen über mehrere Tage erfolgen, um etwa Enzyminduktionen, Auswirkungen auf Transkriptionsvorgänge oder Effekte auf die intrazellulären Signalwege zu bestimmen. Da z.B. Thapsigargin ein hydrophobes Agens ist, also die Zellmembran durchdringen kann und somit in subzelluläre Kompartimente vordringt, könnten auch Regulationsvorgänge auf Transkriptionsebene eine Rolle spielen. Andererseits spielen sich Vorgänge auf Transkriptionsebene in Stunden bis Tagen ab, während unsere Versuchsabläufe nach Thapsigargin-Applikation noch maximal 60 Minuten währten.

Auch ist ML-9 kein selektiver TRPC-6-Kanalblocker. Es hat diverse andere Eigenschaften, unter anderem inhibiert es den insulinstimulierten Glukosetransport in Rattenadipozyten durch Inhibition der PKB. Auch eine Inhibition der PKA wurde beschrieben (Smith et al., 2000).

Durch die Messungen in dieser Arbeit konnte das subzellulär verbliebene Kalzium in den Organellen nicht bestimmt werden. Deshalb ist eine Aussage über eventuell erhöhte subzelluläre Ca^{2+} -Konzentration in den Muskelfasern nicht möglich.

Messungen an ganzen Zellen haben den Vorteil, dass die Messergebnisse immer das Reaktionsverhalten des kompletten Spektrums exprimierter Ionenkanäle spiegeln. Es handelt sich also um die Reaktion der Gesamtzelle, sofern, wie in dieser Arbeit, nicht mit Knockout-Maustypen experimentiert wird. Der Versuchsaufbau stellt die tatsächlichen in-vivo Vorgänge dar.

Ein weiterer Vorteil des Versuchsaufbaus liegt in der hohen zeitlichen Auflösung der Ergebnisse. Dadurch konnten Veränderungen und deren Folgen schnell registriert werden.

Der eingesetzte Farbstoff Fura-2 trägt ebenfalls zur Detektion schneller Veränderungen bei, da Ionen schnell (Dissoziationsrate von $84 \cdot \text{s}^{-1}$ (Jackson et al., 1987)) gebunden und schnell wieder abgegeben werden.

4.2. Probleme und deren Vorbeugung

Der Farbstoff Fura-2/AM wird durch Exposition gegenüber UV-Bestrahlung ausgebleicht und die Messergebnisse können dadurch verfälscht werden (Becker und Fay, 1987). Das Ausbleichen des Farbstoffes wurde minimiert, indem die Messungen in einem vollständig abgedunkelten Labor durchgeführt und die notwendige UV-Bestrahlung möglichst kurz gehalten wurden. Die Exposition während der Messschleifen betrug für die Zellen insgesamt nur wenige Sekunden. Außerdem sorgte der Monochromator dafür, dass die Zellen nur mit Licht der Exzitationswellenlängen bestrahlt wurden, die gesamte restliche UV-Strahlung, die ebenfalls zum Photobleaching beigetragen hätte, konnte damit ausgeschaltet werden. Kontrollmessungen über 45 Minuten zeigten ohne Lösungswechsel, dass die Fluoreszenz noch immer nahezu 100% des Ausgangswertes betrug (siehe Abb. 3.19).

Die Hydrolyse von Fura-2/AM ist zum Teil unvollständig, sodass es in der Zelle persistiert. Dieses nicht hydrolysierte Fura hat eine gewisse Eigenfluoreszenz und kann damit das Messergebnis verfälschen (Oakes et al., 1988). Dieser Effekt tritt insbesondere bei hohen Farbkonzentrationen auf. Durch die relativ geringe Konzentration, in den hier durchgeführten Messungen, konnte diesem Effekt entgegengewirkt werden.

Da die Dissoziationskonstante des Fura-2-Ca²⁺-Komplexes abhängig ist von Parametern wie dem pH-Wert, der Ionenstärke, der Temperatur, der Proteinkonzentration oder auch der Viskosität (Gryniewicz, Poenie und Tsien, 1985) wurden stets standardisierte Lösungen verwendet und die Fasern vor und nach der Inkubation gewaschen.

Durch die Verwendung von Thapsigargin und der damit verbundenen Inhibition der Kalzium-ATPase im SR konnte es zu Kontraktionen der quergestreiften Muskelzellen kommen. Dies hatte Einfluss auf die Fluoreszenz, da der Farbstoff nach Kontraktion der Muskelfaser in erhöhter Schichtdicke vorkam. Deshalb war die Verwendung eines Kontraktionsblockers unumgänglich. BTS inhibiert die Myosin-ATPase und verhindert damit den Gleitfilamentmechanismus. Kontrollmessungen ergaben keinen signifikanten Einfluss des BTS auf die Quenchrage.

Um die Anzahl möglicher störender Einflüsse gering zu halten, wurde immer nach den gleichen standardisierten Abläufen vorgegangen. Alle Fasern wurden gleich lange kultiviert, inkubiert und nach dem gleichen Schema untersucht. Exemplarische Vergleichsmessungen bezogen auf den Faserdurchmesser, das Geschlecht, das Faservolumen und das Alter der Maus erbrachten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Reaktionsverhaltens.

4.3. Der erhöhte Influx von Kalzium in mdx-Skelettmuskelzellen

Bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit war insbesondere von Interesse, ob der Einstrom divalenter Ionen in die Skelettmuskelfasern teilweise durch den TRPC6 Kanal gewährleistet wird.

Zunächst stand jedoch wieder die Frage nach dem erhöhten Kalziueinstrom in Dystrophin-defizienten Skelettmuskelfasern im Raum, welche schon seit langer Zeit leidenschaftlich von vielen verschiedenen Forschungsgruppen geführt wird. Fest steht, dass eine Veränderung der Kalziumhomöostase existiert. Noch immer interessiert die Frage, ob diese durch einen gesteigerten Influx von divalenten Ionen über die Plasmamembran zu Stande kommt (Turner et al., 1991) (Hopf et al., 1996) (Tutdibi et al., 1999) (De Backer et al., 2002) (Vandebrouck et al., 2002). Auch haben einige Gruppen die L-Typ Kalziumkanäle in ihrem Blickfeld. Auch wenn diese nicht zu einer gesteigerten Kalziumkonzentration führen (Imbert et al., 2001), so haben sie in mdx-Skelettmuskeln veränderte Eigenschaften im Vergleich zu WT-Skelettmuskeln und lassen sich durch Expression von Minidystrophin wieder in ihre normale Funktion überführen (Friedrich et al., 2004) (Vandebrouck et al., 2007). Nach neueren Erkenntnissen sind ihre Eigenschaften direkt abhängig vom Dystrophin (Friedrich et al., 2008).

Weitere Arbeitsgruppen sehen andere Mechanismen aus dem Inneren der Zellen dafür verantwortlich und negieren den erhöhten Kalziueinstrom (Han, Grounds und Bakker, 2006).

So genannte „Elementary-Calcium-Release-Events“ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum könnten auch eine mögliche Ursache sein (Teichmann et al., 2008).

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen den gesteigerten Influx über die Plasmamembran nicht unwahrscheinlicher. Auch wenn der Vergleich zwischen dem WT- und dem mdx-Quench nicht signifikant unterschiedlich ist, so ist die Korrelation der beiden Werte mit einem p-Wert von 0,11 nahe an der Signifikanz. Wir gehen davon aus, dass sich bei weiterer Erhöhung der Experimentanzahl eine Signifikanz ergeben hätte. Somit könnten wir den erhöhten Kalziueinstrom über die Plasmamembran tendenziell bestätigen, wenn auch nur in einem geringern Umfang als er beispielsweise bei Tutdibi et al. (Tutdibi et al., 1999) beschrieben wurde. Diese Gruppe hatte eine Quenchrage von $3,98 \% \cdot \text{min}^{-1}$ gefunden, während wir eine Rate von $3,5 \% \cdot \text{min}^{-1}$ in mdx-Mäusen messen konnten. Bei Tutdibi et al. wurden die Zellen jedoch nach 2 bis 10 Tagen für die Messungen verwendet, während die Skelettmuskelfasern dieser Arbeit zwischen dem ersten und zweiten Tag verwendet wurden. Auch die Daten von DeBaker et al. (De Backer et al., 2002) lassen sich gut mit denen dieser Arbeit vergleichen.

Sie fanden für die WT-Fasern einen Wert von $2,89\% \cdot \text{min}^{-1}$ also nahezu identisch mit dem dieser Arbeit von $3,0\% \cdot \text{min}^{-1}$. Bei den mdx-Fasern ergibt sich jedoch ein ähnliches Bild wie mit Tutdibi. Die Rate liegt hier bei $4,2\% \cdot \text{min}^{-1}$ und damit höher als die hier gemessenen Werte. Allerdings merken auch DeBaker et al. einen Zusammenhang mit der Länge der Kultivierung der Skelettmuskelfasern in der Zellkultur an. Nach den Hinweisen anderer Arbeiten, die allerdings mit Myotuben experimentierten, ist die Erhöhung der Permeabilität für divalente Ionen wohl auch durch das Alter der Fasern determiniert (Han, Grounds und Bakker, 2006). Dies wiederum könnte den Unterschied zwischen den verglichenen Arbeiten erklären.

Letztlich gehen auch wir davon aus, dass der Einstrom von Kalziumionen in muskeldystrophischen Zellen erhöht ist.

4.4. TRPC6 und der basale Kalziumeinstrom

Ausgehend von der Annahme, dass in Dystrophin-defizienten Muskelfasern ein erhöhter Einstrom von Kalziumionen besteht und ein möglicher Zusammenhang mit der TRPC Familie postuliert wurde (Vandebrouck et al., 2002), wollten wir in Erfahrung bringen, ob der TRPC6 Kanal einen Anteil an diesem Phänomen hat, indem wir ihn mit ML-9 blockierten.

Je nach möglichem Mechanismus des Kalziumeinstromes werden verschiedene TRPC Kanäle genannt. Neuere Studien gehen davon aus, dass die erhöhte Kalziumkonzentration allein ausreicht um die phänotypischen Symptome einer Muskeldystrophie hervorzubringen und das diese allein durch Überexpression von TRPC Kanälen verursacht werden können (Millay et al., 2009).

Weiterhin werden TRPC1 und TRPC6 auch als Kandidaten für den „Stretch-Activated-Calcium-Entry“ genannt (Allen et al., 2010).

Das ML-9 hat in den Messungen dieser Arbeit keinerlei Einfluss auf den basalen Kalziumeinstrom gezeigt. Weder in den Muskelfasern der Wildtyp Mäuse noch bei mdx-Mäusen konnten signifikante Unterschiede der Quenchraten im Vergleich zur Kontrolle ohne ML-9 festgestellt werden. Auch Variationen der ML-9 Konzentrationen ergaben keine Veränderungen. Wir gehen daher davon aus, dass der erhöhte Kalziumeinstrom in den mdx-Skelettmuskelfasern nicht mit einer Beteiligung des TRPC6 Kanals zustande kommt.

Für alle Versuche dieser Arbeit gilt jedoch die Einschränkung, dass sich die TRPC Kanäle sowohl in Heteromultimeren als auch Homomultimeren zusammen lagern können. Die Heteromultimere haben dabei andere biologische Eigenschaften (Venkatachalam und Montell, 2007), sodass unsere Aussage nicht uneingeschränkt stehen bleiben kann. Sollte der TRPC6

Kanal im Muskel in Heteromultimeren vorkommen, die gänzlich andere Eigenschaften haben, so könnte der Kanal dennoch eine Rolle beim Kalziumeinstrom spielen. Denn die Forschungsgruppe, die die Inhibition des TRPC6 Kanals durch ML-9 entdeckte (Shi et al., 2007), arbeitete an HEK293 Zellen in denen ausschließlich der TRPC6 Kanal überexprimiert wurde.

Andererseits haben weitere Experimente unseres Labors eine Blockierung des TRPC6 Kanals durch ML-9 auch an Muskelzellen gezeigt, nachdem der Kanal zuvor aktiviert wurde. Dies geschah durch Hyperforin, einem Aktivator des TRPC6 Proteins (Leuner et al., 2007), der jedoch die anderen Untergruppenmitglieder (TRPC1, 3, 4, 5 und 7) nicht beeinflusst. Nach Anstieg der basalen Quenchrates durch Hyperforin konnte diese wieder durch ML-9 gesenkt werden. Der Kanal scheint somit in inaktiver Form vor zu liegen, denn der basale Quench ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht durch ML-9 vermindern. Deshalb gehen wir davon aus, dass der Aktivierungsmechanismus des TRPC6 Kanals in Skelettmuskelzellen ROC basiert ist. Dies passt auch zu neueren Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Patel et al, 2010), die allerdings mit Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen arbeiteten.

Mit dieser Feststellung eröffnet sich gleich die nächste Diskussion: funktioniert der TRPC6 Kanal in den Skelettmuskelzellen nur „Receptor-Operated“, was den TRP Kanälen zu ihrem Namen verhalf oder doch auch „Store-Operated“.

4.5. TRPC6 und der SOCE

Diese Arbeit ist die erste, die den SOCE Mechanismus sowohl von Wildtyp Mäusen (C57 BL 10 SCsn) als auch von mdx-Mäusen (C57BL 10 SC / Dmdy) miteinander mittels Mangan-Quench-Technik vergleicht. Dies geschah mit Hilfe einer Kalziumspeicherentleerung durch Thapsigargin.

Der SOCE Mechanismus war in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Arbeiten. Zumindest die Rolle von STIM1 als Sensorprotein scheint unstrittig. Dennoch bleibt zumindest das Zusammenspiel der Kanalproteine undurchsichtig. Ist Orai allein für den Kalziumeinstrom zuständig oder doch die TRPC Kanäle? Oder ist es ein Zusammenspiel der verschiedenen Proteine die sich in makromolekularen Komplexen zusammenlagern?

Einige Forschungsgruppen hatten die TRPC Familie als möglichen Träger des SOCE im Visier. Besonders häufig wurde in diesem Zusammenhang der TRPC1 Kanal genannt, aber auch TRPC3 und TRPC6.

Allerdings soll der TRPC1 Kanal in ausgereiften Muskelzellen nicht „store dependent“ arbeiten (Zanou et al., 2010) (Berbey et al., 2009), was er in unausgereiften Muskelzellen jedoch tut (Louis et al., 2008) (Sabourin et al., 2009) (Antigny et al., 2013). Es scheint also als sei er in der Differenzierungsphase der Fasern von Bedeutung für den SOCE, nicht jedoch in der adulten Phase.

Dennoch funktioniert der SOCE Mechanismus auch in kultivierten, ausgereiften Mäuseskelettmuskelzellen, wie auch diese Arbeit eindrucksvoll zeigt. Wer aber ist dann zuständig für den Kalziumeinstrom nach SR-Entleerung? Nach dem TRPC3 Kanal wird der TRPC6 im M. tibialis anterior von Mausskelettmuskelzellen von allen TRPC Kanälen am zweitstärksten exprimiert (Krüger et al., 2008). In einer anderen Arbeit gab es die höchsten Expressionen durch TRPC3, 1, 2 und 6 im M. tibialis anterior, EDL und M. soleus (Zanou et al., 2010). Für die Beteiligung des TRPC3 Kanals am SOCE existieren bereits Studien (Kim et al., 2009), wenn auch nicht an Skelettmuskelzellen. Der TRPC3 Kanal bleibt also ein Kandidat für den SOCE Mechanismus in Skelettmuskelzellen. Auch der TRPC6 Kanal wurde mehrfach als Kandidat für den Store-Operated-Calcium-Entry genannt (Liao et al., 2007) (Brechard et al., 2008) (Jardin et al., 2009). Allerdings arbeiteten diese Gruppen mit HEK-Zellen, Granulozyten bzw. Thrombozyten. Die transfizierten HEK-Zellen stellen zudem keine in vivo Situation dar, sondern manipulierte Zellen.

Die andere Seite des Spektrums bilden Forschungsgruppen die ein Zusammenspiel zwischen der TRPC Familie und den SOCE unwahrscheinlich erscheinen lassen (DeHaven et al., 2009). Sie gehen davon aus, dass der SOCE allein durch STIM1 und Orai bewerkstelligt wird. Die TRPC's haben nach ihnen lediglich eine ROC Funktion und demnach keinen Anteil am SOCE.

Neueste Studien belegen eine Aufteilung des SOCE in einen Orai-Anteil und einen TRPC-Anteil (TRPC1). Dabei übernimmt der Orai-Kanal den größeren Anteil des Kalziumeinstromes und der TRPC1-Kanal den kleineren. Ein Unterschied ist, dass wenn der TRPC1-Kanal ausfällt, der Kalziumeinstrom lediglich geringer ausfällt, während bei Ausfall des Orai-Proteins der gesamte Kalziumeinstrom ausfällt (Cheng et al, 2011) .

Da die Blockierung des TRPC6 Kanals in dieser Arbeit keine Auswirkungen auf die Zellen zeigte, schlussfolgern wir, dass der Kanal in Skelettmuskelzellen keinen Anteil am nativen SOCE hat. Zumindest für den TRPC6 Kanal in diesem spezifischen Zelltyp, sprechen die Ergebnisse für einen rezeptorstimulierten Kanal.

Unsere Ergebnisse bezüglich der Aktivierungsgeschwindigkeit des SOCE zeigen, dass der Mechanismus relativ lange benötigt um in vollem Umfang zu funktionieren. Dies passt gut zu bisherigen Erkenntnissen zur Geschwindigkeit beim Zusammenspiel zwischen STIM1 und

Orai/TRPC (Zhao et al., 2008), wonach sich die STIM1 Moleküle zunächst in den „Punctae“ zusammenlagern müssen um die Kanäle der Plasmamembran zu aktivieren. Sowohl in WT-Fasern als auch bei den mdx-Mäusen waren in den mit Thapsigargin-vorbehandelten Zellen deutlich stärkere Quenchraten zu beobachten, als in Skelettmuskelfasern bei denen die Zugabe des Thapsigargin unmittelbar während der Aufzeichnungen erfolgte.

Eine andere Erkenntnis aus dieser Arbeit widerspricht dieser Ansicht jedoch. Laut einer Forschungsgruppe soll ML-9 die Verschiebung von STIM1 in die „Punctae“-Struktur, nach SR-Entleerung, reversibel inhibieren (Smyth et al., 2008). Diese konzentrationsabhängige Inhibition wurde jedoch ebenfalls an HEK293 Zellen beobachtet. Übertragen auf unsere Arbeit hätte dies einen totalen Block des SOCE in den Experimenten mit ML-9-Vorinkubation nach Thapsigarginzugabe bedeuten müssen. Nichts dergleichen war jedoch zu beobachten. Am ehesten können wir uns das damit erklären, dass STIM1 und Orai durch Smyth et al. überexprimiert wurden und es somit sein kann, dass durch ML-9 bestimmte Bindungsstellen des STIM1 besetzt wurden, die bei normaler Expression gar nicht zu erreichen sind. Daraus jedoch die STIM1 Theorie zu verwerfen erscheint uns zu weit hergeholt. Dafür wird sie durch zu viele Experimente gestützt.

4.6. Ausblick

Da durch neue Arbeiten eine Aufteilung des SOCE in einen Orai-Anteil und einen TRPC-Anteil belegt werden (Cheng et al., 2011), TRPC1 im Skelettmuskel aber geringfügiger exprimiert wird (Krüger et al., 2008) und TRPC6 trotz Expression nicht zum basalen Kalziumeinstrom oder dem SOCE beiträgt, wie diese Arbeit nahe legt, sollten weitere Experimente mit Blockern des TRPC3 Kanals durchgeführt werden, da dieser in den betreffenden Muskelzellen ebenfalls verstärkt exprimiert wird (Krüger et al., 2008) und bei Überexpression von TRCP3 die phänotypischen Symptome einer Muskeldystrophie zu beobachten sind (Millay et al., 2009).

Eine Validierung unserer Ergebnisse könnte durch Verwendung einer TRPC6 Knockout-Maus oder das Anwenden des Spinnengiftes GsMTx (Inoue et al., 2009), welches ebenfalls den TRPC6 Kanal inhibiert, erfolgen.

Für sinnvoll erachten wir weiterhin eine Klärung, ob der TRPC6 Kanal in Skelettmuskelzellen als Homo- oder Heterotetradimer vorliegt, da dies einen Einfluss auf sein Verhalten haben könnte. Auch ob ein Unterschied in seinem Reaktionsverhalten auf ML-9 vorliegt, je nachdem ob es sich um ein Homo- oder Heteromultimer handelt, sollte abgeklärt werden.

5. Zusammenfassung

Der TRPC6 Kanal ist Teil einer Familie nicht selektiver Kationenkanäle, den Transient-Receptor-Potential-Canonical Kanälen. Der TRPC6 Kanal ist durch Diacylglycerol, welches durch die Phospholipase C freigesetzt werden kann, aktivierbar, während er durch ML-9 inhibiert wird. In der Skelettmuskulatur von Wildtyp-Mäusen und Dystrophin-defizienten mdx-Mäusen wird der TRPC6 Kanal stark exprimiert. Eine Beteiligung des TRPC6-Kanals am Store-Operated-Calcium-Entry (SOCE) wurde ebenso diskutiert wie ein Vorliegen als Rezeptor-gesteuerter Ionenkanal (ROC). In dieser Arbeit wurde der Kalziumeinstrom des Sarkolemms mit Hilfe der Mangan-Quench-Technik an Mäuseskelettmuskelzellen untersucht. Der TRPC6 Kanal wurde mittels ML-9 inhibiert mit dem Ziel einen möglichen Einfluss des TRPC6 Kanals auf den Kalziumeinstrom in den Skelettmuskelzellen der Mäuse, sowohl in Ruhe als auch nach Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher, zu untersuchen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass der TRPC6 Kanal nicht zum basalen Kalziumeinstrom in der Skelettmuskulatur beiträgt. Er ist dort zwar hoch exprimiert, jedoch unter Ruhebedingungen nicht aktiv. Da der Kanal durch DAG und auch Hyperforin physiologisch aktivierbar ist, spricht dies für ein Vorliegen als Rezeptor-gesteuerter Kanal in Skelettmuskelzellen.

Durch die Anwendung des SERCA-Inhibitors Thapsigargin konnte der SOCE sowohl in Wildtyp- als auch mdx-Skelettmuskelzellen dargestellt werden. Nach Vorinkubation mit Thapsigargin zeigte sich jeweils circa eine Verdoppelung der Quenchraten im Vergleich zu den Ruhebedingungen. Auch nach Entleerung der Kalziumspeicher blieb der TRPC6 Kanal inaktiv. Der TRPC6-Kanal ist am SOCE-Mechanismus, zumindest in Skelettmuskelzellen von Mäusen, nicht beteiligt. Eine Beteiligung anderer Mitglieder der TRPC-Familie bleibt jedoch denkbar.

Für eine mögliche Beteiligung des Kanals am pathologisch erhöhten Kalziumeinstrom des Sarkolemms, wie sie im Rahmen der Pathogenese der Duchenne-Muskeldystrophie diskutiert wird, konnten in dieser Arbeit keine Hinweise gefunden werden. Hinsichtlich der getesteten Parameter unterschieden sich die Muskelfasern von Wildtyp-Mäusen nicht von den Zellen Dystrophin-defizienter mdx-Mäuse.

6. Literaturverzeichnis

Abramovici, H., Hogan, A.B., Obagi, C., Topham, M.K., Gee, S.H. (2003): Diacylglycerol kinase-zeta localization in skeletal muscle is regulated by phosphorylation and interaction with syntrophins. *Mol Biol Cell*, 14(11): p. 4499-511.

Alderton, J.M. and R.A. Steinhardt (2000): How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc Med*, 10(6): p. 268-72.

Allen, D.G., Gervasio, O.L., Yeung, E.W., Whitehead, N.P. (2010): Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. *Can J Physiol Pharmacol*, 88(2): p. 83-91.

Ambudkar, I.S. (2007): TRPC1: a core component of store-operated calcium channels. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 1): p. 96-100.

Antigny, F., Koenig, S., Bernheim, L., Frieden, M. (2013): During post-natal human myogenesis, normal myotube size requires TRPC1 and TRPC4 mediated Ca²⁺ entry. *J Cell Sci*.

Becker, P.L. and Fay, F.S. (1987): Photobleaching of fura-2 and its effect on determination of calcium concentrations. *Am J Physiol*, 253(4 Pt 1): p. C613-8.

Beech, D.J. (2005): TRPC1: store-operated channel and more. *Pflügers Arch*, 451(1): p. 53-60.

Berbey, C., Weiss, N., Legrand, C., Allard, B. (2009): Transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) operates as a sarcoplasmic reticulum calcium leak channel in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 284(52): p. 36387-94.

Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E., Davies, K.E. (2002): Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*, 2002. 82(2): p. 291-329.

Brechard, S., Melchior, C., Plancon, S., Schenten, V., Tschirhart, E.J. (2008): Store-operated Ca²⁺ channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes. *Cell Calcium*, 44(5): p. 492-506.

Brown, R.H., Jr. (1997): Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies. *Annu Rev Med*, 48: p. 457-66.

Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A., Moore, K.J. (1984): X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81(4): p. 1189-92.

Campanelli, J.T., Roberds, S.L., Campbell, K.P., Scheller, R.H. (1994): A role for dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR clustering. *Cell*, 77(5): p. 663-74.

Campbell, K.P. and Kahl, S.D. (1989): Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*, 338(6212): p. 259-62.

Cheng, K.T., Liu, X., Ong, H.L., Swaim, W., Ambudkar, I.S. (2011): Local Ca⁽²⁾⁺ entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca⁽²⁾⁺ signals required for specific cell functions. *PLoS Biol*, 9(3): p. e1001025.

Claflin, D.R. and Brooks, S.V. (2008): Direct observation of failing fibers in muscles of dystrophic mice provides mechanistic insight into muscular dystrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294(2): p. C651-8.

Clapham, D.E., Montell, C., Schultz, G., Julius, D. (2003): International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev*, 55(4): p. 591-6.

Cobbold, P.H. and Rink, T.J. (1987): Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem J*, 248(2): p. 313-28.

Cohn, R.D. and Campbell, K.P. (2000): Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*, 23(10): p. 1456-71.

Collet, C., Allard, B., Tourneur, Y., Jacquemond, V. (1999): Intracellular calcium signals measured with indo-1 in isolated skeletal muscle fibres from control and mdx mice. *J Physiol*, 520 Pt 2: p. 417-29.

Dalkilic, I. and Kunkel, L.M. (2003): Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Curr Opin Genet Dev*, 13(3): p. 231-8.

Danieli, G.A., Mioni, F., Muller, C.R., Vitiello, L., Mostacciuolo, M.L., Grimm, T. (1993): Patterns of deletions of the dystrophin gene in different European populations. *Hum Genet*, 91(4): p. 342-6.

De Backer, F., Vandebrouck, C., Gailly, P., Gillis, J.M. (2002): Long-term study of Ca(2+) homeostasis and of survival in collagenase-isolated muscle fibres from normal and mdx mice. *J Physiol*, 542(Pt 3): p. 855-65.

DeHaven, W.I., Jones, B.F., Petranka, J.G., Smyth, J.T., Tomita, T., Bird, G.S., Putney, J.W., Jr. (2009): TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1. *J Physiol*, 587(Pt 10): p. 2275-98.

Dietrich, A. and Gudermann, T. (2007): Trpc6. *Handb Exp Pharmacol*, (179): p. 125-41.

Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., Kalwa, H., Storch, U., Gudermann, T. (2005): Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 371(4): p. 257-65.

Dziadek, M.A. and Johnstone, L.S. (2007): Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins. *Cell Calcium*, 42(2): p. 123-32.

Ervasti, J.M. and Campbell, K.P. (1993): A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol*, 122(4): p. 809-23.

Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M., Rao, A. (2006): A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090): p. 179-85.

Florence, J.M., Fox, P.T., Planer, G.J., Brooke, M.H. (1985): Activity, creatine kinase, and myoglobin in Duchenne muscular dystrophy: a clue to etiology? *Neurology*, 35(5): p. 758-61.

Fong, P.Y., Turner, P.R., Denetclaw, W.F., Steinhardt, R.A. (1990): Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. *Science*, 250(4981): p. 673-6.

Franco-Obregon, A., Jr. and Lansman, J.B. (1994): Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. *J Physiol*, 481 (Pt 2): p. 299-309.

Friedrich, O., von Wegner, F., Chamberlain, J.S., Fink, R.H., Rohrbach, P (2008): L-type Ca²⁺ channel function is linked to dystrophin expression in mammalian muscle. *PLoS One*, 2008. 3(3): p. e1762.

Friedrich, O., Both, M., Gillis, J.M., Chamberlain, J.S., Fink, R.H. (2004): Mini-dystrophin restores L-type calcium currents in skeletal muscle of transgenic mdx mice. *J Physiol*, 555(Pt 1): p. 251-65.

Gailly, P., Boland, B., Himpens, B., Casteels, R., Gillis, J.M. (1993): Critical evaluation of cytosolic calcium determination in resting muscle fibres from normal and dystrophic (mdx) mice. *Cell Calcium*, 14(6): p. 473-83.

Grigoriev, I., Gouveia, S.M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J.T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M.O., Putney, J.W., Jr., Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A. (2008): STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Curr Biol*, 18(3): p. 177-82.

Grozdanovic, Z. and Baumgarten, H.G. (1999): Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signaling component of the dystrophin-glycoprotein complex. *Histol Histopathol*, 14(1): p. 243-56.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260(6): p. 3440-50.

Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, M., and Dietrich, A. (2004): Receptor-operated cation entry--more than esoteric terminology? *Sci STKE*, 2004(243): p. pe35.

Gwack, Y., Feske, S., Srikanth, S., Hogan, P.G., Rao, A. (2007): Signalling to transcription: store-operated Ca^{2+} entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium*, 42(2): p. 145-56.

Hallam, T.J., Jacob, R. and Merritt, J.E. (1989): Influx of bivalent cations can be independent of receptor stimulation in human endothelial cells. *Biochem J*, 259(1): p. 125-9.

Han, R., Grounds, M.D. and Bakker, A.J. (2006): Measurement of sub-membrane $[Ca^{2+}]$ in adult myofibers and cytosolic $[Ca^{2+}]$ in myotubes from normal and mdx mice using the Ca^{2+} indicator FFP-18. *Cell Calcium*, 40(3): p. 299-307.

Hoffman, E.P., Brown, R.H. Jr. and Kunkel, L.M. (1987): Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51(6): p. 919-28.

Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., Schultz, G. (1999): Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, 397(6716): p. 259-63.

Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., Gudermann, T. (2002): Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11): p. 7461-6.

Hopf, F.W., Turner, P.R., Denetclaw, W.F. Jr., Reddy, P., Steinhardt, R.A. (1996): A critical evaluation of resting intracellular free calcium regulation in dystrophic mdx muscle. *Am J Physiol*, 271(4 Pt 1): p. C1325-39.

Hoth, M. and Penner, R. (1992): Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355(6358): p. 353-6.

Huang, G.N., Zeng, W., Kim, J.Y., Yuan, J.P., Han, L., Muallem, S., Worley, P.F. (2006): STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol*, 2006. 8(9): p. 1003-10.

Imbert, N., Vandebrouck, C., Duport, G., Raymond, G., Hassoni, A.A., Constantin, B., Cullen, M.J., Cognard, C. (2001): Calcium currents and transients in co-cultured contracting normal and Duchenne muscular dystrophy human myotubes. *J Physiol*, 534(Pt. 2): p. 343-55.

Inoue, R., Jensen, L.J., Jian, Z., Shi, J., Hai, L., Lurie, A.I., Henriksen, F.H., Salomonsson, M., Morita, H., Kawarabayashi, Y., Mori, M., Mori, Y., Ito, Y. (2009): Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via phospholipase C/diacylglycerol and phospholipase A2/omega-hydroxylase/20-HETE pathways. *Circ Res*, 104(12): p. 1399-409.

Iwata, Y., Katanosaka, Y., Arai, Y., Komamura, K., Miyatake, K., Shigekawa, M. (2003): A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. *J Cell Biol*, 161(5): p. 957-67.

Iwata, Y., Katanosaka, Y., Arai, Y., Shigekawa, M., Wakabayashi, S. (2009): Dominant-negative inhibition of Ca²⁺ influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animal models. *Hum Mol Genet*, 18(5): p. 824-34.

Jackson, A.P., Timmermann, M.P., Bagshaw, C.R., Ashley, C.C. (1987): The kinetics of calcium binding to fura-2 and indo-1. *FEBS Lett*, 216(1): p. 35-9.

Jardin, I., Gomez, L.J., Salido, G.M., Rosado, J.A. (2009): Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1-STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca(2+) entry pathways. *Biochem J*, 420(2): p. 267-76.

Jockusch, H., Reininghaus, J., Stuhlfauth, I., Zippel, M. (1988): Reduction of myosin-light-chain phosphorylation and of parvalbumin content in myotonic mouse muscle and its reversal by tocainide. *Eur J Biochem*, 171(1-2): p. 101-5.

Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J.S., Campbell, K.P. (1995): Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem*, 270(45): p. 27305-10.

Kiessling, W.R. and Beckmann, R. (1981): Serum levels of myoglobin and creatine kinase in Duchenne muscular dystrophy. *Klin Wochenschr*, 59(7): p. 347-8.

Kim, M.S., Hong, J.H., Li, Q., Shin, D.M., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., Muallem, S. (2009): Deletion of TRPC3 in mice reduces store-operated Ca²⁺ influx and the severity of acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 137(4): p. 1509-17.

Kiviluoto, S., Decuyper, J.P., De Smedt, H., Missiaen, L., Parys, J.B., Bultynck, G. (2011): STIM1 as a key regulator for Ca²⁺ homeostasis in skeletal-muscle development and function. *Skelet Muscle*, 1(1): p. 16.

Koenig, M., Monaco, A.P. and Kunkel, L.M. (1988): The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, 53(2): p. 219-28.

Krüger, J., Kunert-Keil, C., Bisping, F., Brinkmeier, H. (2008): Transient receptor potential cation channels in normal and dystrophic mdx muscle. *Neuromuscul Disord*, 18(6): p. 501-13.

Lansman, J.B. and Franco-Obregon, A. (2006): Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle: a link in the membrane pathology of muscular dystrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33(7): p. 649-56.

Lee, K.P., Yuan, J.P., Hong, J.H., So, I., Worley, P.F., Muallem, S. (2010): An endoplasmic reticulum/plasma membrane junction: STIM1/Orai1/TRPCs. *FEBS Lett*, 584(10): p. 2022-7.

Lee, K.P., Yuan, J.P., Zeng, W., So, I., Worley, P.F., Muallem, S. (2009): Molecular determinants of fast Ca²⁺-dependent inactivation and gating of the Orai channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(34): p. 14687-92.

Leuner, K., Kazanski, V., Muller, M., Essin, K., Henke, B., Gollasch, M., Harteneck, C., Muller, W.E. (2007): Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *Faseb J*, 21(14): p. 4101-11.

Liao, Y., Erxleben, C., Yildirim, E., Abramowitz, J., Armstrong, D.L., Birnbaumer, L. (2007): Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(11): p. 4682-7.

Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T., Meyer, T. (2007): Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(22): p. 9301-6.

Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E. Jr., Meyer, T. (2005): STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol*, 15(13): p. 1235-41.

Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., Penner, R. (2007): CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Curr Biol*, 17(9): p. 794-800.

Louis, M., Zanou, N., Van Schoor, M., Gailly, P. (2008): TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *J Cell Sci*, 121(Pt 23): p. 3951-9.

MacLennan, P.A., McArdle, A. and Edwards, R.H. (1991): Effects of calcium on protein turnover of incubated muscles from mdx mice. *Am J Physiol*, 260(4 Pt 1): p. E594-8.

Mallouk, N., Jacquemond, V. and Allard, B. (2000): Elevated subsarcolemmal Ca²⁺ in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9): p. 4950-5.

Mariol, M.C. and Segalat, L. (2001): Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. *Curr Biol*, 11(21): p. 1691-4.

Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Martinac, B., Hamill, O.P. (2005): TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol*, 7(2): p. 179-85.

Matsuda, R., Nishikawa, A. and Tanaka, H. (1995): Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J Biochem*, 118(5): p. 959-64.

McCarter, G.C. and Steinhardt, R.A. (2000): Increased activity of calcium leak channels caused by proteolysis near sarcolemmal ruptures. *J Membr Biol*, 176(2): p. 169-74.

McDonough, P.M. and Button, D.C. (1989): Measurement of cytoplasmic calcium concentration in cell suspensions: correction for extracellular Fura-2 through use of Mn²⁺ and probenecid. *Cell Calcium*, 10(3): p. 171-80.

Menke, A. and Jockusch, H. (1995): Extent of shock-induced membrane leakage in human and mouse myotubes depends on dystrophin. *J Cell Sci*, 108 (Pt 2): p. 727-33.

Millay, D.P., Goonasekera, S.A., Sargent, M.A., Maillet, M., Aronow, B.J., Molkentin, J.D. (2009): Calcium influx is sufficient to induce muscular dystrophy through a TRPC-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(45): p. 19023-8.

Monaco, A.P., Neve, R.L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C.J., Kurnit, D.M., Kunkel, L.M. (1986): Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*, 323(6089): p. 646-50.

Montell, C. (2005): The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, 2005(272): p. re3.

Mullins, F.M., Park, C.Y., Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S. (2009): STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(36): p. 15495-500.

Murray, J.M., Davies, K.E., Harper, P.S., Meredith, L., Mueller, C.R., Williamson, R. (1982): Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, 300(5887): p. 69-71.

Nilius, B. (2004): Store-operated Ca²⁺ entry channels: still elusive! *Sci STKE*, 2004(243): p. pe36.

Oak, S.A., Zhou, Y.W. and Jarrett, H.W. (2003): Skeletal muscle signaling pathway through the dystrophin glycoprotein complex and Rac1. *J Biol Chem*, 278(41): p. 39287-95.

Oakes, S.G., Martin, W.G., Lisek, C.A., Powis, G. (1988): Incomplete hydrolysis of the calcium indicator precursor fura-2 pentaacetoxymethyl ester (fura-2 AM) by cells. *Anal Biochem*, 169(1): p. 159-66.

O'Brien, K.F. and Kunkel, L.M. (2001): Dystrophin and muscular dystrophy: past, present, and future. *Mol Genet Metab*, 74(1-2): p. 75-88.

Okada, T., Inoue, R., Yamazaki, K., Maeda, A., Kurosaki, T., Yamakuni, T., Tanaka, I., Shimizu, S., Ikenaka, K., Imoto, K., Mori, Y. (1999): Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca²⁺-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 274(39): p. 27359-70.

Ong, H.L. and Ambudkar, I.S. (2011): The dynamic complexity of the TRPC1 channelosome. *Channels (Austin)*, 5(5): p. 424-31.

Parekh, A.B., Fleig, A. and Penner, R. (1997): The store-operated calcium current I_{CRAC}: nonlinear activation by InsP₃ and dissociation from calcium release. *Cell*, 89(6): p. 973-80.

Park, C.Y., Hoover, P.J., Mullins, F.M., Bachhawat, P., Covington, E.D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K.C., Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S. (2009): STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*, 136(5): p. 876-90.

Pasternak, C., Wong, S. and Elson, E.L. (1995): Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol*, 128(3): p. 355-61.

Patel, A., Sharif-Naeini, R., Folgering, J.R., Bichet, D., Duprat, F., Honore, E. (2010): Canonical TRP channels and mechanotransduction: from physiology to disease states. *Pflügers Arch*, 460(3): p. 571-81.

Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Safrina, O., Parker, I., Cahalan, M.D. (2008): The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature*, 456(7218): p. 116-20.

Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M., Sweeney, H.L. (1993): Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(8): p. 3710-4.

Pressmar, J., Brinkmeier, H., Seewald, M.J., Naumann, T., Rudel, R. (1994): Intracellular Ca²⁺ concentrations are not elevated in resting cultured muscle from Duchenne (DMD) patients and in MDX mouse muscle fibres. *Pflügers Arch*, 426(6): p. 499-505.

Rafael, J.A. and Brown, S.C. (2000): Dystrophin and utrophin: genetic analyses of their role in skeletal muscle. *Microsc Res Tech*, 48(3-4): p. 155-66.

Rivet-Bastide, M., Imbert, N., Cognard, C., Duport, G., Rideau, Y., Raymond, G. (1993): Changes in cytosolic resting ionized calcium level and in calcium transients during in vitro development of normal and Duchenne muscular dystrophy cultured skeletal muscle measured by laser cytofluorimetry using indo-1. *Cell Calcium*, 14(7): p. 563-71.

Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., Velicelebi, G., Stauderman, K.A. (2005): STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol*, 169(3): p. 435-45.

Sabourin, J., Lamiche, C., Vandebrouck, A., Magaud, C., Rivet, J., Cognard, C., Bourmeyster, N., Constantin, B. (2009): Regulation of TRPC1 and TRPC4 cation channels requires an alpha1-syntrophin-dependent complex in skeletal mouse myotubes. *J Biol Chem*, 284(52): p. 36248-61.

Sadoulet-Puccio, H.M., Rajala, M. and Kunkel, L.M. (1997): Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(23): p. 12413-8.

Schaefer (2005): M., Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflügers Arch*, 451(1): p. 35-42.

Shi, J., Takahashi, S., Jin, X.H., Li, Y.Q., Ito, Y., Mori, Y., Inoue, R. (2007): Myosin light chain kinase-independent inhibition by ML-9 of murine TRPC6 channels expressed in HEK293 cells. *Br J Pharmacol*, 152(1): p. 122-31.

Smith, U., Carvalho, E., Mosialou, E., Beguinot, F., Formisano, P., Rondinone, C. (2000): PKB inhibition prevents the stimulatory effect of insulin on glucose transport and protein

translocation but not the antilipolytic effect in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 268(2): p. 315-20.

Smyth, J.T., Dehaven, W.I., Bird, G.S., Putney, J.W.Jr. (2008): Ca²⁺-store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function. *J Cell Sci*, 121(Pt 6): p. 762-72.

Stathopoulos, P.B., Li, G.Y., Pelvin, M.J., Ames, J.B., Ikura, M. (2006): Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *J Biol Chem*, 281(47): p. 35855-62.

Stathopoulos, P.B., Zheng, L., Li, G.Y., Pelvin, M.J., Ikura, M. (2008): Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry. *Cell*, 135(1): p. 110-22.

Stiber, J., Hawkins, A., Zhang, Z.S., Wang, S., Burch, J., Graham, V., Ward, C.C., Seth, M., Finch, E., Malouf, N., Williams, R.S., Eu, J.P., Rosenberg, P. (2008): STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol*, 10(6): p. 688-97.

Straub, V. and Campbell, K.P. (1997): Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol*, 10(2): p. 168-75.

Suchyna, T.M. and Sachs, F. (2007): Mechanosensitive channel properties and membrane mechanics in mouse dystrophic myotubes. *J Physiol*, 581(Pt 1): p. 369-87.

Sundivakkam, P.C., Freichel, M., Singh, V., Yuan, J.P., Vogel, S.M., Flockerzi, V., Malik, A.B., Tirupathi, C. (2011): The Ca(2+) sensor stromal interaction molecule 1 (STIM1) is necessary and sufficient for the store operated Ca(2+) entry function of transient receptor potential canonical (TRPC) 1 and 4 channels in endothelial cells. *Mol Pharmacol*, 81(4): p. 510-26.

Suzuki, A., Yoshida, M., Yamamoto, H., Ozawa, E. (1992): Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain. *FEBS Lett*, 308(2): p. 154-60.

Teichmann, M.D., Wegner, F.V., Fink, R.H., Chamberlain, J.S., Launikonis, B.S., Martinac, B., Friedrich, O. (2008): Inhibitory control over Ca(2+) sparks via mechanosensitive channels is disrupted in dystrophin deficient muscle but restored by mini-dystrophin expression. *PLoS One*, 3(11): p. e3644.

Turner, P.R., Fong, P.Y., Denetclaw, W.F., Steinhardt, R.A. (1991): Increased calcium influx in dystrophic muscle. *J Cell Biol*, 115(6): p. 1701-12.

Turner, P.R., Westwood, T., Regen, C.M., Steinhardt, R.A. (1993): Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. *Nature*, 335(6192): p. 735-8.

Turner, P.R., Schultz, R., Ganguly, B., Steinhardt, R.A. (1993): Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in mdx muscle. *J Membr Biol*, 133(3): p. 243-51.

Tutdibi, O., Brinkmeier, H., Rudel, R., Fohr, K.J. (1999): Increased calcium entry into dystrophin-deficient muscle fibres of MDX and ADR-MDX mice is reduced by ion channel blockers. *J Physiol*, 515 (Pt 3): p. 859-68.

Uto, A., Arai, H., Ogawa, Y. (1991): Reassessment of Fura-2 and the ratio method for determination of intracellular Ca²⁺ concentrations. *Cell Calcium*, 12(1): p.29-37.

Vaca, L. and Sampieri, A. (2002): Calmodulin modulates the delay period between release of calcium from internal stores and activation of calcium influx via endogenous TRP1 channels. *J Biol Chem*, 277(44): p. 42178-87.

Vandebrouck, A., Sabourin, J., Rivet, J., Balghi, H., Sebille, S., Kitzis, A., Raymond, G., Cognard, C., Bourmeyster, N., Constantin, B. (2007): Regulation of capacitative calcium entries by alpha1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin. *Faseb J*, 21(2): p. 608-17.

- Vandebrouck, C., Martin, D., Colson-Van Schoor, M., Debaix, H., Gailly, P. (2002): Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J Cell Biol*, 158(6): p. 1089-96.
- Venkatachalam, K. and Montell, C. (2007): TRP channels. *Annu Rev Biochem*, 76: p. 387-417.
- Way, M., Pope, B., Cross, R.A., Kendrick-Jones, J., Weeds, A.G. (1992): Expression of the N-terminal domain of dystrophin in *E. coli* and demonstration of binding to F-actin. *FEBS Lett*, 301(3): p. 243-5.
- Worley, P.F., Zeng, W., Huang, G.N., Yuan, J.P., Kim, J.Y., Lee, M.G., Muallem, S. (2007): TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels. *Cell Calcium*, 42(2): p. 205-11.
- Yang, B., Jung, D., Motto, D., Meyer, J., Koretzky, G., Campbell, K.P. (1995): SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem*, 270(20): p. 11711-4.
- Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., Cahalan, M.D. (2006): Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*, 443(7108): p. 226-9.
- Yuan, J.P., Zeng, W., Dorwart, M.R., Choi, Y.J., Worley, P.F., Muallem, S. (2009): SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat Cell Biol*, 11(3): p. 337-43.
- Yuan, J.P., Zeng, W., Huang, G.N., Worley, P.F., Muallem, S. (2007): STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol*, 2007. 9(6): p. 636-45.
- Yuan, J.P., Lee, K.P., Hong, J.H., Muallem, S. (2012): The closing and opening of TRPC channels by Homer1 and STIM1. *Acta Physiol (Oxf)*, 204(2): p. 238-47.
- Zanou, N., Iwata, Y., Schakman, O., Lebacqz, J., Wakabayashi, S., Gailly, P. (2009): Essential role of TRPV2 ion channel in the sensitivity of dystrophic muscle to eccentric contractions. *FEBS Lett*, 583(22): p. 3600-4.

Zanou, N., Shapovalov, G., Louis, M., Tajeddine, N., Gallo, C., Van Schoor, M., Anguish, I., Cao, M.L., Schakman, O., Dietrich, A., Lebacqz, J., Ruegg, U., Roulet, E., Birnbaumer, L., Gailly, P. (2010): Role of TRPC1 channel in skeletal muscle function. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010. 298(1): p. C149-62.

Zeng, W., Yuan, J.P., Kim, M.S., Choi, Y.J., Huang, G.N., Worley, P.F., Muallem, S. (2008): STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Mol Cell*, 32(3): p. 439-48.

Zhang, S.L., Yeromin, A.V., Zhang, X.H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K.A., Cahalan, M.D. (2006): Genome-wide RNAi screen of Ca²⁺ influx identifies genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(24): p. 9357-62.

Zhao, X., Weisleder, N., Thornton, A., Oppong, Y., Campbell, R., Ma, J., Brotto, M. (2008): Compromised store-operated Ca²⁺ entry in aged skeletal muscle. *Aging Cell*, 7(4): p. 561-8.

Zhou, Y., Jiang, D., Thomason, D.B., Jarrett, H.W. (2007): Laminin-induced activation of Rac1 and JNKp46 is initiated by Src family kinases and mimics the effects of skeletal muscle contraction. *Biochemistry*, 46(51): p. 14907-16.

Zhou, Y., Mancarella, S., Wang, Y., Yue, C., Ritchie, M., Gill, D.L., Soboloff, J. (2009): The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of Orai1 channels. *J Biol Chem*, 284(29): p. 19164-8.

7. Danksagung

Ich möchte mich von Herzen bei meiner Freundin Judith für ihre jahrelange Unterstützung und Liebe, für viele Opfer und zahlreiche Entbehren bedanken. Nur diese Hilfe hat es mir überhaupt ermöglicht diese Arbeit zu stemmen. Es war nicht immer einfach mit all den Aufgaben, den langen Nächten und meinen durchwachsenen Launen, aber jetzt haben wir ja nur noch die „kleinen“ Aufgaben des Lebens vor uns.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Heinrich Brinkmeier für die Vergabe des Themas, welches ich lieb gewonnen habe und seine Geduld mit mir. Ich weiß es sehr zu schätzen, dass Sie immer ansprechbar waren, selbst auf Flughäfen beim Umsteigen, und sich die notwendige Zeit genommen haben die es braucht, um ein so komplexes Thema zu bearbeiten. Das ist, aus meiner Erfahrung, keine Selbstverständlichkeit. Ich habe mir durch Ihre Kritik und Anregungen eine neue Sichtweise auf die Wissenschaft und ihre Komplexität erarbeitet, die mir großen Respekt vor den Leistungen der Forschungstätigkeit abringt.

Ich bin ebenso Herrn Dr. Bernd Pritschow zu großem Dank verpflichtet, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand im Labor, sowie für konstruktive Kritik und nette Gespräche. Wir mussten uns immer den Arbeitsplatz teilen und man sollte meinen, dass dabei Reibung entsteht. Doch schwer war es eben nie, danke für deine Flexibilität. Danke auch für deine Einweisung in die Präparation der Mäuse, die Software und die Problembewältigung am Messplatz.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. Christiane Kunert-Keil für ihre immer bestehende Ansprechbarkeit und ihre Offenheit.

Weiterhin danke ich Yaxin Zhang für die Mühen. Danke für die unzähligen Emails, für die Zellabmessungen und die Beratung. Auch wenn es sprachlich manchmal schwer erschien haben wir uns doch immer verstanden.

Vielen Dank auch an Joachim Kasch, selbst wenn wir nie zusammengearbeitet haben. Ohne Ihre Akribie und Ihre Anleitung in Sachen Laborbuch wäre eine Zurückverfolgung und Auswertung meiner Daten wohl in einem endlosen Chaos versunken.

Auch Heidrun Kenk, die gute Seele, muss hier Erwähnung finden. Vielen Dank für deine Flexibilität in Sachen Arbeitsvorbereitung. Mir läuft noch immer ein Schauer über den Rücken, wenn ich an den Kühlraum denke und wie viel Zeit du dort verbracht hast mit dem Auftragen der Matrix, weil ich mal wieder in der Nacht Messungen durchführen wollte.

Ein besonderer Dank gilt natürlich auch meinen „Leidensgenossen“ Marike Stoll, Elisabeth Oerding und Thom Lange für die vielen geteilten Autoreisen nach Karlsburg und den regen

Informationsaustausch bezüglich des Vorranschreitens und manchmal eben auch des Stockens im Prozess der Doktorarbeit.

Weiterhin danke ich allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pathophysiologie. Die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre ist mir in guter Erinnerung geblieben.

Außerdem danke ich meiner Familie für ihre ideelle und finanzielle Unterstützung. Für eure Geduld, Beharrlichkeit und Nachsicht mit mir. Ohne euch wäre all das nie möglich gewesen.

Zu guter letzt möchte ich meinen Mäusen die Ehre erweisen, die ihnen gebührt. Ihr wurdet zahlreich für die Forschung geopfert. Ich habe es nicht gerne getan.