

1. Einleitung:

1.1 Die Muskeldystrophien

Die Muskeldystrophien bilden ein Kollektiv von genetisch determinierten Erkrankungen, die durch fortschreitende Muskelschwäche, Nekrose und Ersatz des verlorenen Muskels durch Fett- und Bindegewebe charakterisiert sind (Murray et al., 1982; Hoffmann et al., 1991; Emery und Emery, 1995; Berchtold et al., 2000). Die Ursachen sind Fehlfunktionen oder Fehlen bestimmter, körpereigener Eiweißmoleküle, die Bestandteil von Muskelzellen sind (Murray et al., 1982; Hoffmann et al., 1991; Bron und Pongratz, 2004). Bekannt sind bisher mehr als 30 verschiedene Formen der Muskeldystrophie, die sich unter anderem nach der Vererbungsart, primärer Krankheitslokalisation, dem Manifestationsalter sowie nach der Schwere und Progredienz unterscheiden (Bron und Pongratz, 2004). Von diesen Muskeldystrophien stellt die Duchenne Muskeldystrophie die schwerwiegendste Form dar.

1.2 Die Duchenne Muskeldystrophie

Die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne, auch DMD genannt, gehört zu der Gruppe der „Dystrophia musculorum progressiva“. Sie ist bisher nicht heilbar und geht mit einer progredienten Behinderung sowie einer stark verkürzten Lebenserwartung einher (Hoffmann et al., 1991; Emery und Emery, 1995; Bron und Pongratz, 2004). Die Leitsymptome sind eine fortschreitende, symmetrische, von bestimmten Körperregionen ausgehende Muskelschwäche, welche schon im Kleinkindalter beginnt, rasch voranschreitet und im jungen Erwachsenenalter immer tödlich verläuft (Speer, 1993; Emery und Emery, 1995; De La Porte et al., 1999). Man bezeichnet sie daher auch als maligne, also bösartige, Muskeldystrophie. Bereits 1851 wurde das klinische Bild von EDWARD MERYON beschrieben. Er stellte drei wichtige Merkmale heraus:

1. Es sind nur männliche Individuen betroffen.
2. Es wurden keine Schädigungen im Rückenmark gefunden.
3. Durch histologische Beobachtungen wurde festgestellt, dass der Defekt im Sarkolemm der Muskelfasern liegt.

Die Arbeit geriet jedoch in Vergessenheit, so dass 1868 die Krankheit durch GUILLAUME BENJAMIN AMAND DUCHENNE erneut in großen Details beschrieben und daher nach ihm benannt wurde (Speer, 1993; De La Porte et al., 1999; Bron und Pongratz, 2004)

Der Beginn der Duchenne Muskeldystrophie ist nicht klar zu definieren. Schon sehr früh sind histologische Veränderungen in Muskelschnitten erkennbar. So zeigen sich Muskelfasernekrosen, ein Anstieg der Größenvariabilität und Spaltbildung von Muskelfasern sowie zentralisierte Muskelfaserkerne und mesenchymale Proliferation (Speer, 1993). Die Neugeborenen fallen gelegentlich durch eine allgemeine Muskelhypotonie auf. Die frühkindliche Entwicklung der betroffenen Knaben ist relativ normal, allerdings verzögert sich bei 50 % der Kinder die motorische Entwicklung (Emery und Emery, 1995). Sie werden erst nach dem 18. Lebensmonat gehfähig. Später zeigt sich, dass die Patienten in der Regel nicht flüssig laufen können und es zu häufigem Hinfallen und Stolpern kommt. Deutlichere Symptome sind im Alter von etwa 3 bis 8 Jahren erkennbar. Es kommt zu einer primären Schwäche der Hüftstrecker mit Beckenkipfung nach vorn und kompensatorischer lumbaler Lordose (Rückradverkrümmung im Beckenbereich), was in einen watschelnden Gang resultiert. Weitere Symptome sind die frühe Pseudohypertrophie der Wadenmuskeln und dadurch später hervorgerufen ein Spitzfußgang. Schwierigkeiten beim Treppensteigen und das Gowersche Zeichen, wobei sich die Kinder aus liegender Position erst auf den Bauch drehen, um sich dann, an sich selbst empor kletternd, aufzurichten (siehe Abb. 1), sind ebenfalls deutliche Symptome der DMD (Speer, 1993; Emery und Emery, 1995; Bron und Pongratz, 2004).

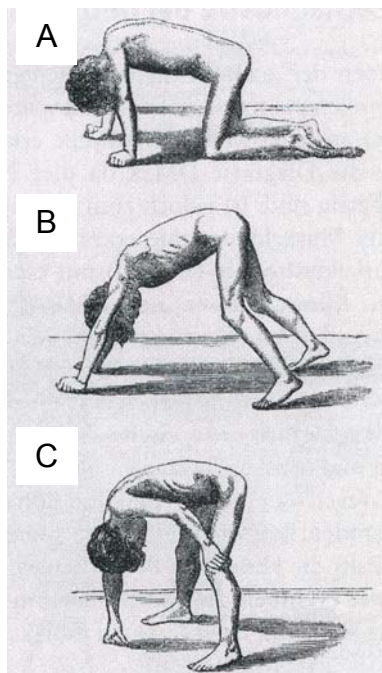


Abb. 1: Das Gowersche Zeichen bei DMD-Patienten.

Die Patienten drehen sich zunächst auf den Bauch (A) um sich dann, an Gegenständen oder an sich selber stützend, aufzurichten (B, C). (Bron und Pongratz, 2004)

Schon im 5. - 7. Lebensjahr können Treppensteigen und Aufstehen aus dem Sitzen oder Liegen nur noch mit fremder Hilfe möglich sein, da die Erkrankung auch auf die Muskulatur der Schultern und Arme übergreift. Vom 8. bis 10. Lebensjahr verschlechtert sich der Allgemeinzustand der Patienten deutlich. Es kommt zu Kontrakturen und Skoliosen der Muskulatur, wodurch die Kinder auf den Rollstuhl angewiesen sind (Speer, 1993; Emery und Emery, 1995). Zwischen dem 10. und 15. Lebensjahr muss mit einer Verminderung der Lungenfunktion gerechnet werden, welches durch vorhandene Thoraxdeformationen noch verstärkt wird. In diesem Stadium ist der Herzmuskel zwar mit betroffen und die Herzleistung eingeschränkt, zu schwerwiegenden kardialen Problemen kommt es aber selten (Emery und Emery, 1995; Bron und Pongratz, 2004). Die Erkrankung betrifft hauptsächlich die quergestreifte Muskulatur, in späten Erkrankungsstadien kann es aber auch zu Funktionsstörungen der glatten Muskulatur, z.B. Magendilatationen, kommen. Die restriktive Ventilationsstörung macht eine tracheale Beatmung notwendig, weiterhin können Kau- und Schluckprobleme auftreten. Die Lebenserwartung ist vor allem durch die kardialen und pulmonalen Funktionsstörungen, aber auch durch Erkrankungen wie Infektionen deutlich herabgesetzt und beträgt etwa 18 bis 25 Jahre (Speer, 1993; Emery und Emery, 1995; Bron und Pongratz, 2004). Bei ca. 30 % der Kinder liegt der Intelligenz-Quotient im niedrigen Bereich, wobei der verbale IQ tiefer liegt, als der Handlungs-IQ. Die mentale Behinderung ist aber nicht progredient (Emery und Emery, 1995; Bron und Pongratz, 2004).

Bei der Diagnostik der DMD wird zunächst nach allgemeinen Auffälligkeiten geschaut, wie Gelenkveränderungen, Organvergrößerungen oder aber einer verminderten Lungenfunktion. Bei der speziellen neurologischen Untersuchung werden die Funktion der Nerven und Muskeln, sowie deren Steuerung überprüft. In Laboruntersuchungen werden unter anderem Muskelenzyme wie die Kreatinkinase, aber auch Stoffwechselprodukte, wie z.B. Aldolase, Pyruvat, Ammoniak und Laktat bestimmt. So kann vor und nach der Geburt im Blutserum eine deutlich erhöhte Plasmakreatinkinaseaktivität (CK) mit Werten von mehr als 10.000 U/l gemessen werden (Florence et al., 1985; Emery und Emery, 1995; Bron und Pongratz, 2004). Für die Diagnose ist die Muskelbiopsie entscheidend. Sie erlaubt Untersuchungen des Muskels unter dem Licht- und dem Elektronenmikroskop sowie auf histologischer Ebene. Der fehlende Nachweis von Dystrophin führt zu einer eindeutigen Diagnose der DMD (Emery und Emery, 1995; Speer, 1993; Bron und Pongratz, 2004).

Für die Duchenne Muskeldystrophie gibt bisher keine kausale, das heißt gegen die Ursache gerichtete Therapie. Ziele der Behandlungen sind die Verbesserung und das Erhalten der Selbständigkeit in der Beweglichkeit und Selbstversorgung sowie der Teilhabe am sozialen Leben. Die Behandlung kann durch leichte Massagen oder Bewegung erfolgen, wobei immer berücksichtigt werden muss, dass die Muskulatur sehr dehnungsempfindlich ist und eine erhöhte Belastung zu weiterem Muskelabbau führt. Das Training ermöglicht nicht nur eine Besserung der körperlichen Leistungsfähigkeit, sondern trägt auch dazu bei, das Körpergewicht zu halten, Schmerzen durch Fehlbelastungen zu mindern und depressive Verstimmungen zu beseitigen. Weiterhin kann operatives Lösen von Kontrakturen die Zeit der Gehfähigkeit verlängern. Bei der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne wurde gezeigt, dass der medikamentöse Einsatz von Kortison die Dauer der Gehfähigkeit verlängern kann, trotz Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme und Osteoporose. Auch die Gabe von Kreatin führt zu einer kurzzeitigen Verbesserung der Muskelkraft des Patienten, langfristige Auswirkungen sind aber noch nicht bekannt (Speer, 1993; Bron und Pongratz, 2004).

1.3 Die Ursache der DMD

Die Ursache für die Duchenne Muskeldystrophie wurde auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms in der Region Xp21 lokalisiert (Murray et al., 1982; Monaco et al., 1986; Speer, 1993; Emery und Emery, 1995; Bron und Pongratz, 2004). Diese Region kodiert für das Dystrophin. Das menschliche Dystrophin ist mit über 2300 kB genomischer DNA das bisher größte bekannte menschliche Gen (Hoffmann et al., 1991). Nur 0,5 % davon gehören zu den 79 kodierenden Exons. Die 13973 Bp große mRNA des DMD-Gens wird in ein Protein übersetzt, welches aus 3685 Aminosäuren mit einem gesamten Molekulargewicht von etwa 427 kDa besteht (Hoffmann et al., 1991; De La Porte et al., 1999; Grimm und Kress, 2006).

Dystrophin ist überwiegend ein muskuläres Protein. Es findet sich gleichermaßen in der quergestreiften Muskulatur des Skelettmuskels und des Herzens. Der Anteil des Dystrophins am Gesamtprotein im normalen Muskel beträgt nur 0,002 % (Hoffmann et al., 1991; De La Porte et al., 1999; Grimm und Kress, 2006). Das Dystrophin ist in den Kostameren verankert. Diese verbinden die Z-Region der Sarkomere, welche die kontraktile Strukturen darstellen, mit dem Sarkolemm und ermöglichen so die Kraftübertragung. Dystrophin ist also für die mechanische Stabilität des Sarkolems während der Muskelkontraktion von entscheidender Bedeutung. Der Aminoterminus des Dystrophins ist mit dem β -Aktin-Netzwerk des Zytoskeletts auf der Innenseite der Muskelzellmembran verbunden.

Mit dem C-terminalen Molekülende ist es an einem Komplex von Dystrophin-assoziierten Glycoproteinen (α -, β -, γ -, δ -Sarkoglycane, β -Dystroglycan) gebunden, welche sich im Sarkolemm befinden (Abb. 2) (Jung et al., 1995; Straub und Campbell, 1997; De La Porte et al., 1999; Yeung et al., 2005). Zusammen bilden die Membranproteine eine membranüberspannende Einheit, den Dystrophin-Glycoprotein-Komplex (Jung et al., 1995; Cohn und Campbell, 2000; Turk et al., 2005), der eine Verbindung zwischen dem Aktin und der extrazellulären Basallamina herstellt. Das Netzwerk enthält aber noch andere wichtige Proteine. Zu ihnen gehören Synthropine, Dystrobrevin, NO-Synthase und weitere Proteine wie Dysferlin, Sarcospan, Laminin, Caveolin, Telethonin, Myotilin, Agrin, Neurexin, Aquaporin, Spektrin, Kollagen und Calpain (Yeung et al., 2005). Das Fehlen von Dystrophin führt zu einer Zerstörung des Gleichgewichtes zwischen den verschiedenen Teilen des Dystrophin-Komplexes. Besonders die Dystro- und Sarkoglycane werden vermindert exprimiert oder verschwinden vollständig (Berchtold et al., 2000).

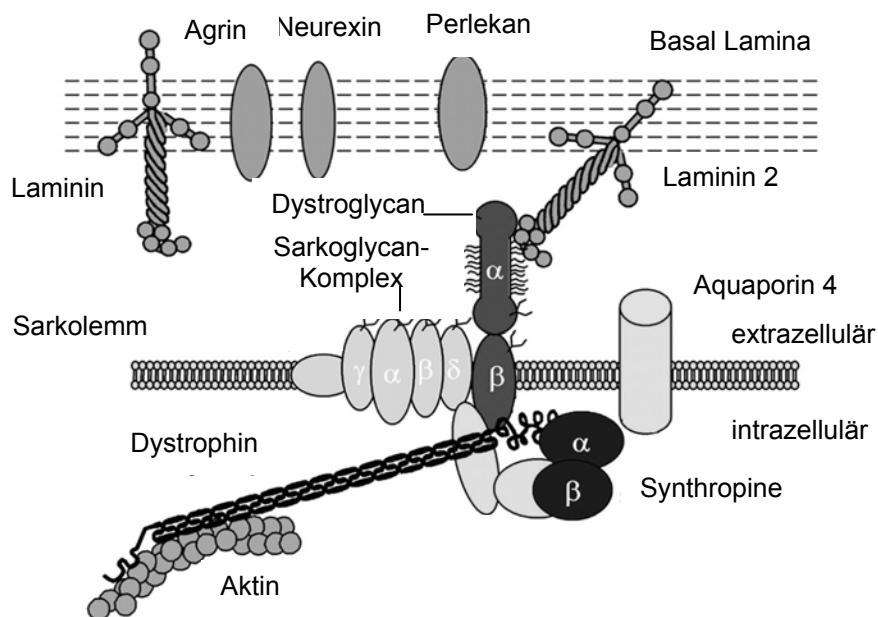


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Längsschnitts einer Muskelfaser und dem membranspannenden Dystrophin-Glycoprotein-Komplex.

Aktin ist mittels Dystrophin über den Dystroglycankomplex und Laminin mit der extrazellulären Matrix verbunden. Durch diese Proteinkomplexe erfolgt eine Stabilisierung des Sarkolemms. (modifiziert nach Michele und Campbell, 2003)

Ein Verlust des Dystrophins kommt durch Mutationen im Dystrophingen zustande. Bei etwa 60 % der DMD-Patienten kann eine Deletion einzelner oder mehrerer Exons nachgewiesen werden. Duplikationen werden bei etwa 5 – 10 % der Patienten gefunden (Grimm und Kress, 2006). Die Mutationen sind nicht gleichmäßig über das Gen verteilt, sondern bilden zwei „*hot spots*“ im Bereich der Exons 3 – 19 (etwa 30 % der Deletionen) und der Exons 44 – 52 (etwa 70 % der Deletionen) (Abb. 3) (Grimm und Kress, 2006).

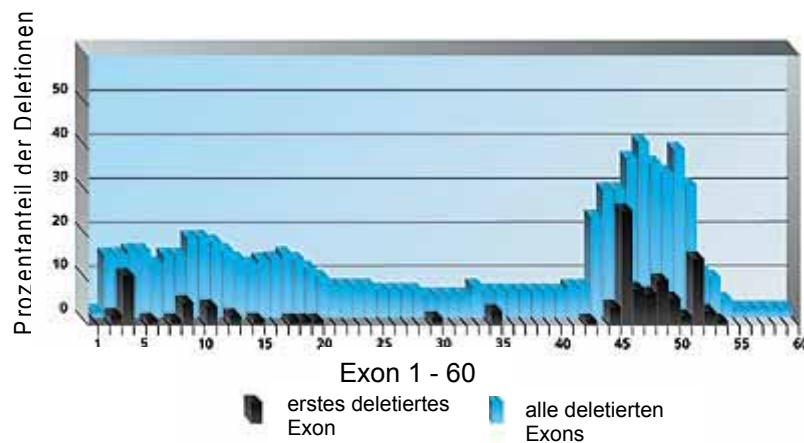


Abb. 3: Darstellung der Deletionen im Dystrophin-Gen.

Die Mehrzahl der Deletionen liegen in den Exons 3 - 19 und 44 - 52 (Abbildung modifiziert nach Grimm und Kress, 2006).

Die Größe der Deletion hat normalerweise keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Krankheit. Das so genannte „*Frame-Shift*“-Prinzip besagt, dass bei 90 % der Patienten Deletionen das Leseraster des Triplett-Codes unterbrechen und danach in der Regel ein Stoppcodon zufällig vorkommt (Grimm und Kress, 2006). Es kann dann nur noch ein instabiles, funktionsloses Protein gebildet werden, welches rasch abgebaut wird. Bei DMD-Patienten werden daher mit Dystrophin-Antikörpern nur noch Spuren oder überhaupt kein Dystrophin in der Skelettmuskulatur nachgewiesen (Abb. 4).

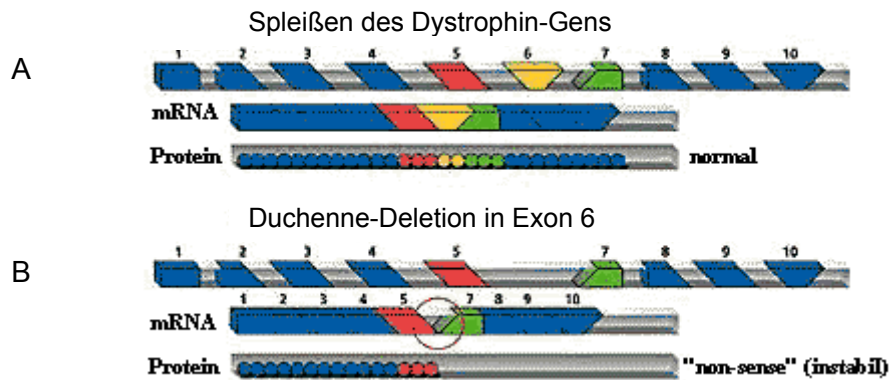


Abb. 4: Das „Frame-Shift“-Prinzip bei der DMD-Entstehung.

Normalerweise erfolgt nach dem Spleißen, d. h. ausschneiden, der Introns (grau) die Bildung der mRNA, welche zur Synthese eines normalen Dystrophin-Proteins führt (A). Bei Mutation kommt es zur fehlerhaften mRNA (hier ohne Exon 6) und damit zu einer Verschiebung des Leserasters. Dies erzeugt zufällig ein Stoppcodon im Leseraster, so dass kein funktionsfähiges Dystrophinmolekül gebildet wird und die Mutation in eine DMD resultiert (B) (Abbildung modifiziert nach Grimm und Kress, 2006).

Beobachtete Ausnahmen der „Frame-Shift“-Theorie konnten durch alternatives Spleißen erklärt werden. Punktmutationen und Mikrodeletionen von wenigen Basenpaaren machen den Rest der Mutationen bei DMD-Patienten aus. Auch die kleinen Mutationen stehen in der Regel im Einklang mit der „Frame-Shift“-Theorie. Mutationen im Dystrophingen treten bei einem von 3500 betroffenen Neugeborenen auf. Damit gehört die DMD zu den häufigsten Muskeldystrophien (Grimm und Kress, 2006).

1.4 Tiermodelle der Duchenne Muskeldystrophie

Mutationen im Dystrophingen treten nicht nur beim Menschen auf, sondern wurden auch bei Tieren gefunden. Durch gezielte Züchtungen wurden Tiermodelle erhalten, an denen die Mutationen und deren Auswirkungen studiert werden können. Für genetische, biochemische und klinische Vergleichsuntersuchungen der DMD stehen gegenwärtig drei Tiermodelle zur Verfügung, bei denen die Anlage zur Muskeldystrophie ebenfalls X-chromosomal vererbt wird. Beim ersten Tiermodell wurde die canine X-chromosomale Muskeldystrophie (CXMD) 1983 erstmals in einer Golden Retriever Zucht beschrieben, wobei die Tiere die Bezeichnung GRMD-Hund (golden retriever muscular dystrophy dog) bekamen (Krämer et al., 1998; De La Porte et al., 1999). Es wurden aber auch Muskeldystrophien bei Irish Terriern und Rottweilern gefunden.

Ihr Dystrophin-Gen hat eine Punktmutation in der Spleißrezeptor-Region des Intron 6, welche zu einer Deletion des Exon 7 in der mRNA und damit zu einer Leserasterverschiebung sowie einem vorzeitigen Stoppcodon führt (Krämer et al., 1998; De La Porte et al., 1999). Das zweite Tiermodell stellt die dystrophe Katze dar. Das erste beschriebene Tier wurde 1985 in den USA geboren. Bei ihr wurde eine Deletion im Dystrophin-Promotor gefunden.

Das am häufigsten verwendete Tiermodell zur Erforschung der DMD ist die mdx-Maus. 1984 wurde durch BULFIELD in einem C57BL/10 Inzuchtstamm eine spontane Mutation im Dystrophingen beschrieben (Bulfield et al., 1984). Die geschlechtsverbundene Vererbung führte zur Namensgebung murine Dystrophie X-chromosomal (mdx) (Bulfield et al., 1984; Hoffmann et al., 1991; Krämer et al., 1998; De La Porte et al., 1999, Rüdell und Brinkmeier, 2002). Die mdx-Maus besitzt eine Punktmutation des Nukleotids 3185 im Exon 23 des Dystrophingens. Diese Mutation verändert das „CAA-Codon“ (Glutamin) in ein „TAA-Codon“, welches ein Stoppcodon darstellt. Dadurch wird die Dystrophinsynthese vorzeitig beendet. Die mdx-Maus verfügt somit über kein funktionsfähiges Dystrophin in den Muskeln (Bulfield et al., 1984; Hoffmann et al., 1991; Speer, 1993; Bron und Pongratz, 2004). Bei vier Tage alten mdx-Mäusen wurden noch keine histologischen Läsionen gefunden. Analysen bei 2 Wochen alten mdx-Mäusen zeigten, dass im Vergleich zu C57Bl/10-Kontrollmäusen keine Unterschiede in der Erregungsleitung bestehen (Carnwath et al., 1987). Des Weiteren sind in jungen mdx-Mäusen die Geschwindigkeit der Kontraktion und Relaxation sowie das Gewicht des Muskulus tibialis anterioris ähnlich wie in gesunden Kontrollmäusen. Es treten aber separate Cluster von Degeneration auf (Rouger et al., 2002). In deren Nähe konnte der Beginn einer Regeneration in Form einer erhöhten Zahl von Myotuben nachgewiesen werden. Die regenerierenden Myotuben haben charakteristisch zentral gelegene Zellkerne. Histologische Analysen von mdx-Mäusen im Alter von drei bis vier Wochen zeigen den Verlust von normalen Muskelfasern (Carnwath et al., 1987). Außerdem sind Variationen in der Muskelfasergröße, eine massive Degeneration von Muskelfasern und Fasern mit zentralen Zellkernen zu finden (Yeung et al., 2005). In diesem Alter treten bei der mdx-Maus eine geringere Leistung, eine schnellere Relaxationszeit und ein verringertes Gewicht des Muskulus tibialis anterioris auf. Tiere im Alter von 5 Wochen zeigen aber Zeichen einer vermehrten Regeneration, wodurch es kaum zur Fibrose oder Muskelfaserverlust kommt (Carnwath et al., 1987). Die mdx-Maus erscheint trotz Muskeldystrophie phänotypisch relativ normal (Carnwath et al., 1987; Krämer et al., 1998).

Bei Tieren im Alter von 26 Wochen führt der Prozess der Degeneration und Regeneration zu 2 Subpopulationen von Muskelfasern, den überlebenden Originalfasern ohne zentrale Zellkerne und neuen, regenerierten Fasern mit Ketten von zentral gelegenen Zellkernen. Etwa 20 % der langsamen Typ-IIA-Fasern und 80 % der schnellen Typ-IIB-Fasern wurden bis zu diesem Alter durch regenerierte Muskelfasern ersetzt. Der Anteil an langsamen Typ-IIA-Fasern ist in den mdx-Muskeln mit ca. 57 % deutlich höher als in Kontrolltieren, wo der Anteil nur bei 30% liegt. Bei mdx-Mäusen, die ein Jahr und älter sind, werden Muskeldegeneration und Regeneration nicht nur im Skelettmuskel, sondern auch im Herzen vermerkt, wobei die Regeneration deutlich rückläufig ist. Weiterhin steigt mit fortschreitendem Alter der mdx-Mäuse der intrazelluläre Kalziumgehalt an (McArdle et al., 1994). Dennoch zeigen mdx-Mäuse im Allgemeinen keine offensichtlichen funktionellen Beeinträchtigungen, egal, welche Altersstufe vorliegt.

1.5 Der Pathomechanismus der Dystrophindefizienz

Die primäre genetische Ursache des Dystrophinmangels ist seit mehreren Jahren bekannt, dennoch ist das Wissen um die biologische Relevanz bisher noch unvollständig (Straub und Campbell, 1997; Zeh, 2004). Es existieren zwei Theorien, welche die pathologischen Erscheinungen durch die Dystrophindefizienz erklären könnten.

A. Hypothese der mechanischen Instabilität

Erwiesenermaßen ist die Dystrophin-defiziente Membran deutlich anfälliger für Membranläsionen und somit durchgängig für gelöste Moleküle (Glesby et al., 1988; Zeh, 2004). Die Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass im Serum von mdx-Mäusen, aber auch schon frühzeitig bei DMD-Patienten verschiedene muskelspezifische, zytoplasmatische Proteine auf hohem Level nachgewiesen wurden, bevor die Degeneration beginnt (Jackson et al., 1985; Florence et al., 1985). Es wurde aber nicht nur ein Ausströmen von Molekülen, sondern auch ein Einströmen, z.B. von Kalziumionen, detektiert (Matsuda et al., 1995). Für Dystrophin-defiziente Fasern scheint ein bidirektionaler Durchfluss von Molekülen durch die Zellmembran charakteristisch zu sein. Der Austausch der Moleküle entsteht während der normalen Muskelaktivität und wird durch mechanischen Stress noch verstärkt (Jackson et al., 1985; Matsuda et al., 1995; Berchtold et al., 2000).

B. Kalziumhypothese

Diese Theorie basiert auf Berichten über Kalziumansammlungen in DMD-Muskelfasern. So wurde in Muskelbiopsien von Patienten ein 2,4-fach erhöhter Ca^{2+} -Gehalt ermittelt (Speer, 1993). Ähnliche Ca^{2+} -Erhöhungen wurden auch in mdx-Muskelfasern gefunden (Jackson et al., 1985; Glesby et al., 1988; Fong et al., 1990).

Weiterhin wurde von einer erhöhten Aktivität von plasmamembranständigen Ca^{2+} -Kanälen in Dystrophin-defizienten Myotuben berichtet (Jackson et al., 1985; Fong et al., 1990; Krämer et al., 1998). Mittels Untersuchungen mit Fluoreszenzindikatoren konnte auch ein erhöhter Ca^{2+} -Spiegel detektiert werden (Hopf et al., 1996; Berchtold et al., 2000).

Der Mechanismus des Ca^{2+} -Einstroms und seine Verbindung zur Dystrophindefizienz ist aber noch nicht vollständig verstanden, ebenso wenig wie die Kalzium-vermittelten Effekte, die für die Muskelfaserdegeneration verantwortlich sind (Fong et al., 1990; Tutdibi et al., 1999).

Die Arbeitsgruppe um Allen (2005) zeigte, dass eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration eine erhöhte Permeabilität der Membran bewirkt und dieser Effekt blockiert werden konnte. Somit könnte die Freisetzung der muskulären Serumenzyme auch auf den erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel beruhen. Um die genannten Theorien genauer zu überprüfen, wurden Analysen mittels der *Mangan-Quensch-Technik* durchgeführt. Hierbei wurden mdx-Myotuben in eine Mn^{2+} -haltige Lösung eingebettet. Die Myotuben enthielten intrazellulär den Fluoreszenzstoff Fura-2, welcher durch UV-Licht angeregt werden kann und anschließend spezifisch fluoresziert. Zweiwertigen Kationen wie Mn^{2+} können mit Fura-2 eine Verbindung eingehen, welche unter Lichtanregung nicht mehr fluoresziert. Bei der *Mangan-Quensch-Technik* wandern die Manganionen analog den Kalziumionen in die Zelle und löschen die intrazellulären Fura-2-Signale aus. Über diese Fluoreszenz-Löschung kann der Kationeneinstrom dokumentiert werden (Tutdibi et al., 1999). Die Arbeitsgruppe von Tutdibi (1999) beobachtete gegenüber den Kontrollen in den mdx-Myotuben eine schneller fortschreitende Auslöschung des Fura-2-Signals, woraus sie auf einen erhöhten Kationeneinstrom schlossen. Des Weiteren konnte der Manganeinstrom durch Gd^{3+} , Amilorid und andere, unspezifische Ionenkanalblocker inhibiert werden, ebenso wie durch pH-Änderungen und Variationen in der Osmolarität (Tutdibi et al., 1999; Berchtold et al., 2000; Zeh, 2004). Durch diese Entdeckungen kam man zu der Annahme, dass eine erhöhte Aktivität oder ein vermehrtes Vorkommen von Kationenkanälen Gründe für den Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels sein könnten (Tutdibi et al., 1999). Aus den wirkenden Inhibitoren des Manganeinstroms lässt sich die Suche nach den Ionenkanälen eingrenzen. So konnte der Kationeneinstrom am wirkungsvollsten mit Amilorid blockiert werden. Diesem Aspekt folgend könnten die verantwortlichen Ionenkanäle aus der Degenerin/ENaC-Familie stammen. Da ein Blockade aber auch mit Gd^{3+} , La^{3+} und Ni^{3+} möglich war, wurde ebenfalls die Transient Receptor Potential Superfamilie (TRP-Familie) von Kationenkanälen ins Visier genommen (Tutdibi et al., 1999), wobei diesen Familienmitgliedern schon eine mögliche Bedeutung bei der Muskelzerstörung bei der DMD eingeräumt wurde (Vandebrouck et al., 2002; Allen et al., 2005).

1.6 Die DEG-/ENaC-Familie und die TRP-Familie von Kationenkanälen

1.6.1 Die Degenerin/ENaC-Familie

Die DEG/ENaC-Familie wurde erstmals in den 90iger Jahren beschrieben (Chalfie und Wollinski, 1990). Bisher sind bisher 8 Proteine bekannt. Sie sind durchweg mittels Amilorid blockierbar (Chalfie und Wollinski, 1990; Kieber-Emmons et al., 1999) und haben eine ähnliche Sequenz und Struktur. Die Proteine besitzen einen zytoplasmatischen Amino- und Carboxyterminus, zwei hydrophobe, transmembrane Segmente und eine große, extrazelluläre Schleife, welche viele Cysteinreste enthält. Die prinzipielle Struktur ist in der Abb. 5 dargestellt.

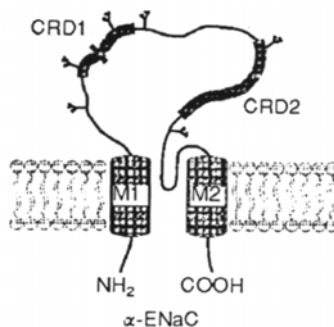


Abb. 5: Schematischer Aufbau der epithelialen Natriumkanäle (ENaCs).

Der NH₂-Terminus und der Carboxyterminus ragen in das Zytoplasma, während zwei transmembrane Segmente die Pore in der Membran formen.

(aus Kieber-Emmons et al., 1999)

Die Mitglieder der DEG/ENaC-Familie sind mechanosensitiv, nicht spannungsgesteuert und im aktivierten Zustand für kleine Kationen permeabel (Garcia-Anoveros et al., 1997; Drummond et al., 2004). Besonders zu nennen sind die epithelialen Natrium-Kanäle (ENaCs), welche als Prototypen dieser Familie angesehen werden (Canessa et al., 1994). Die α -, β - und γ -Untereinheiten können einen heteromultimeren Ionenkanal formen (Garcia-Anoveros et al., 1997; Drummond et al., 2004). In Säugetieren haben die ENaCs eine bedeutende Funktion in der Natriumhomöostase und kommen vor allem in der Niere vor. Sie sind zwar hoch selektiv für Natriumionen, dennoch sind Kanäle (Waldmann et al., 1997) und Mutationen (Kellenberger et al., 1999) bekannt, die den Durchfluss von Kalziumionen ermöglichen.

In diese Subfamilie werden auch die ASICs („acid sensing ion channels“), auch ACCNs genannt, eingeordnet. Sie wurden ursprünglich im Gehirn entdeckt und sind dort in der Schmerzverarbeitung involviert (Waldmann und Lazdunski, 1998). In älteren Arbeiten werden sie auch als „brain Na⁺ channels“ (BNaCs) bezeichnet. Diese Untergruppe ist durch extrazelluläre Protonen aktivierbar, ebenfalls durch Amilorid blockierbar und permeabel für monovalente und divalente Kationen.

1.6.2 Die Transient Rezeptor Potential Superfamilie

Die Benennung der Transient Rezeptor Potential–Superfamilie (TRP-Familie) entstammt einer Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, welche im Elektretinogramm nach Lichtstimulation im Gegensatz zum Wildtyp nur eine transiente Depolarisation zeigte (Montell, 2005; Lis et al., 2005). Die TRP-Superfamilie unterscheidet sich sehr von anderen Gruppen von Ionenkanälen. Sie zeigen eine gewaltige Vielfalt in Bezug auf Ionenselektivität, Aktivierung und physiologische Funktionen (Montell, 2005; Lis et al., 2005). Als gemeinsames Merkmal haben die Kanal-Untereinheiten sechs transmembrane Segmente, wobei die Pore für die Ionen zwischen dem fünften und sechsten Segment gebildet wird (Fleig und Penner, 2004; Lis et al., 2005; Montell, 2005; Kunert-Keil et al., 2006). Jeweils vier Kanal-Untereinheiten bilden einen funktionellen TRP-Kanal. Aufgrund ihrer Sequenzhomologien können einige Vertreter miteinander Heteromultimere bilden, wodurch komplexere Variationen möglich werden (Lis et al., 2005). Die TRPs sind bedeutend für sensorische Transduktionen, wie z. B. das Sehen und Hören, aber auch für das Wärme- und Kälteempfinden, Schmerz und chemische Sinne sowie für das Zellwachstum (Montell, 2005; Kunert-Keil et al., 2006). Von besonderer Bedeutung ist das Mitwirken einiger Vertreter in der Kalziumhomöostase (Kunert-Keil et al., 2006). Mitglieder der TRP-Superfamilie lassen sich durch Gd^{3+} , La^{3+} , Änderungen der Osmolarität, aber auch durch pH-Änderungen blockieren. Der prinzipielle Aufbau der Unterfamilien der TRPs ist in der Abb. 6 dargestellt. Die Unterteilung in die sieben verschiedenen Subfamilien kommt hauptsächlich durch unterschiedliche zytosolische Amino- und Carboxyenden zustande (Montell, 2005).

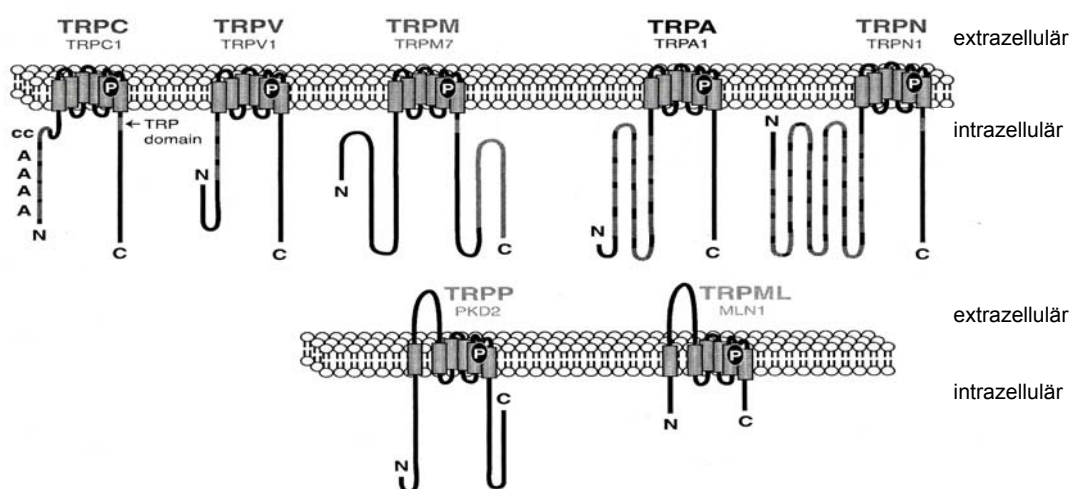


Abb. 6: Schematischer Aufbau der 7 Subfamilien der TRP-Superfamilie.

Als gemeinsames Charakteristikum haben sie 6 transmembrane Segmente, während die zytoplasmatischen Enden sich unterscheiden. Die Pore, hier als P gekennzeichnet, befindet sich zwischen dem fünften und sechsten Segment. (Montell, 2005)

Die ersten identifizierten Mitglieder dieser großen Familie wurden Transient Rezeptor Potential „classical“ oder „canonical“, kurz TRPC genannt. Beim Menschen existieren sieben Gene, wobei TRPC2 ein Pseudogen ist. Die TRPCs sind nichtselektive Kationenkanäle mit unterschiedlichen Permeabilitäten für Kalzium, z. B. TRPC3 $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^{+}} \leq 0,3$; TRPC6 $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^{+}} \leq 6$ (Montell, 2005). Der TRPV-Familie gehören sechs Mitglieder an. Das erste Mitglied wurde innerhalb einer Expressionsstudie mittels Vanilloid-Komponenten entdeckt (Montell, 2005). Die TRPV-Familie kann in zwei Gruppen eingeteilt werden, wobei TRPV5 und 6 eine Gruppe bilden, welche eine hohe Selektivität für Kalziumionen ($P_{Ca^{2+}}/P_{Na^{+}} > 100$) aufweisen. Die anderen Mitglieder sind weniger selektiv für Kalziumionen mit $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^{+}} \leq 10$ (Voets et al., 2002, Vriens et al., 2003). Die Namensgebung der TRPM-Familie erfolgte nach dem Protein Melastatin. Die TRPM-Familie besteht aus acht Mitgliedern. Der Aminoterminus dieser Ionenkanäle besitzt keine Ankyrin-Reste und ist deutlich länger als der von den TRPCs oder TRPVs. Des Weiteren besitzen TRPM6 und 7 noch zusätzliche Enzymaktivitäten am C-Terminus (Fleig und Penner, 2004; Montell, 2005). Die TRPA-Proteine sind durch eine große Anzahl von Ankyrin-Resten in der N-terminalen Domäne charakterisiert und erhalten daher diese Bezeichnung. Im Menschen und in der Maus gibt es nur ein bekanntes Mitglied, während in *Drosophila* drei Proteine gefunden wurden. Die Subfamilien TRPN, TRPP und TRPML sind entfernte Verwandte der TRP-Superfamilie. So ist von der TRPN-Familie nur ein Mitglied in Nematoden, Fliegen und im Zebrafisch bekannt, welches aber nicht in Mäusen oder Menschen identifiziert werden konnte. Von den anderen beiden Subfamilien sind jeweils drei Vertreter bekannt. Die Mitglieder dieser Familien sind bisher wenig erforscht (Fleig und Penner, 2004; Montell, 2005).