

5. Diskussion:

Die zytosolischen Kalziumkonzentrationen spielen eine zentrale Rolle bei vielen grundlegenden zellulären Prozessen, so z.B. dem Zellwachstum und der Gentranskription (Berridge et al., 2003; Pederson et al., 2005). Ca^{2+} -Ionen sind weiterhin entscheidende „second messenger“ des Erregungs-, Kontraktions- und Relaxationszyklusses (Berchtold et al., 2000; Dowling et al., 2004). Änderungen des intrazellulären Kalziumspiegels können durch verschiedene Krankheiten ausgelöst werden (Pedersen et al., 2005). So findet man bei der Duchenne Muskeldystrophie (DMD) und seinem homologen Mausmodell, der mdx-Maus, eine Überladung der Muskelfasern mit Kalziumionen (Jackson et al., 1985; Glesby et al., 1988; Hopf et al., 1996; Vandebrouck et al., 2002; Dowling et al., 2004). Weiterhin führt die veränderte Kalziumhomöostase bei Dystrophindefizienz zur Muskeldegeneration (Hoffmann et al., 1991; Vandebrouck et al., 2002; Allen et al., 2005) bzw. sie spielt eine zentrale Rolle in der Muskelpathologie (Jackson et al., 1985; Berchtold et al., 2000; Pederson et al., 2005). Die Präsenz der Ca^{2+} in der Nähe des Sarkolemm bewirkt einen Zyklus von erhöhter Proteaseaktivität und „ Ca^{2+} -leak-channel“ Aktivierung, welches in einer weiteren Sarkolemmzerstörung (Hopf et al., 1996; Rüdell und Brinkmeier, 2002; Allen et al., 2005) sowie in mitochondrialer Kalziumüberladung resultiert (Jackson et al., 1985; Glesby et al., 1988; Berchtold et al., 2000; Allen et al., 2005). Dass die vermehrte Proteaseaktivität eine Erhöhung der Kalziumkonzentration bewirkt, schlussfolgerte Hopf (1996), wobei durch Inhibierung von Proteasen der Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels verhindert wurde. Die Kalziumüberladung bewirkt eine veränderte Gentranskription, welche nachfolgend zur Apoptose und Nekrose führt (Berchtold et al., 2000; Rüdell und Brinkmeier, 2002).

Die pathologischen Prozesse des erhöhten Kalziumeinstroms in die Muskelzellen sind weitgehend unbekannt. Es wurde vermutet, dass durch die Dystrophindefizienz die Stabilität des Sarkolemm erheblich gemindert wird (Yeung et al., 2005), so dass es zu kurzzeitigen Membranläsionen kommt, wodurch die Kalziumionen, dem Konzentrationsgradienten folgend, ins Zellinnere gelangen können. Das sarkolemmale Kalzium bewirkt seinerseits eine erhöhte Membranpermeabilität, wodurch der Prozess noch verstärkt wird (Allen et al., 2005). Andere Arbeitsgruppen konnten den Kalziumeinstrom in mdx-Muskelfasern unter Verwendung der „Patch-clamp-Technik“ mittels Lanthanionen (Tutdibi et al., 1999; Vandebrouck et al., 2002), Gadoliniumionen (Tutdibi et al., 1999; Allen et al., 2005) und Amilorid (Tutdibi et al., 1999) blockieren, was bedeutete, dass für einen erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel der Hauptteil der Kalziumionen durch Kationenkanäle ins Zellinnere gelangen müssten (Berchtold et al., 2000).

Aufgrund der wirkenden Inhibitoren konnten mögliche verantwortliche Ionenkanäle zwei verschiedenen Kationenkanalfamilien zugeordnet werden, deren Vertreter in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Da die Mitglieder der Degenerin/ENaC-Familie durch Amilorid blockierbar sind (Hummler und Beermann, 2000; Brockway et al., 2002), könnten sie dem entsprechend von Bedeutung für den erhöhten Kalziumspiegel sein.

Aufgrund unserer Analysen, welche zeigten, dass diese Ionenkanäle nur sehr gering im Muskel exprimiert und im Bezug zu Kontrolltieren in ihrer mRNA Expression in mdx-Mäusen nicht verändert sind, wurden die Vertreter der DEG/ENaC-Familie als nicht relevant für die veränderte Kalziumhomöostase bei Dystrophin-defizienten Mäusen angesehen.

Des Weiteren kamen die Mitglieder der TRP-Superfamilie von Kationenkanälen in Betracht, da diese durch die genannten Schwermetallionen und Änderungen der Osmolarität blockierbar sind (Tutdibi et al., 1999). Aus der TRP-Superfamilie wurden die TRPCs, TRPVs, TRPMs und TRPA1 untersucht.

Aus den Analysen der Expression der Mitglieder der TRPC-Familie zeigte sich, dass die mRNAs und die Proteine von TRPC3 und TRPC6 im Muskelgewebe von C57Bl/10Sc und mdx-Mäusen vorherrschend exprimiert wurden. Vandebrouck (2002) indessen sagte aus, das neben TRPC6 noch TRPC1 und TRPC4 im Muskelgewebe dominierend exprimiert sein sollten. Dies konnte nicht bestätigt werden, dagegen wurde TRPC3 als deutlich dominantester Vertreter der TRPC-Familie identifiziert. Kunert-Keil (2006) konnte dies in verschiedenen Mausstämmen zeigen, während andere TRPC3 und TRPC6 in weiteren Muskelgeweben oder Zellen nachgewiesen haben (Riccio et al., 2002; Clapham, 2003; Pedersen et al., 2005). Infolge dessen, dass diese beiden Ionenkanäle nicht-selektiv Kationen leiten und eine höhere Leitfähigkeit für Ca^{2+} als für Na^+ haben (Clapham, 2003; Pedersen et al., 2005), könnten sie Kandidaten für einen veränderten Kalzium-Einstrom darstellen (Allen et al., 2005).

In der vorliegenden Analyse konnte weiterhin eine altersabhängige Expression der Ionenkanäle gezeigt werden. Aus diesen Daten ging hervor, dass im Vergleich zu den Kontrollen TRPC3 in den mdx-Mäusen relativ unverändert exprimiert war, während TRPC6 im Muskelgewebe von mdx-Mäusen signifikant reduziert war. Außerdem wurde in unseren Analysen in Kontrolltieren nur etwa halb so viel TRPC6 gefunden, wie TRPC3.

Da TRPC3 und TRPC6 zu 70 - 80 % sequenzidentisch sind (Clapham, 2003; Diedrich et al., 2005) und die Proteine Heteromultimere bilden können um einen funktionellen Ionenkanal auszubilden (Lis et al., 2005), wäre es möglich, dass TRPC6 in diesem Komplex als regulatorische Untereinheit fungiert. In mdx-Mäusen hat eine Verminderung von TRPC6 vermutlich den Verlust der regulatorischen TRPC6-Funktion zur Folge, so dass der verbleibende Komplex pathologisch konstitutiv offen ist, wodurch die Kalziumionen ins Zellinnere strömen können. Aus Analysen mittels TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-}) Mäusen wird diese Hypothese bekräftigt (Diedrich et al., 2005). Bei diesen Mäusen wurden ein erhöhter Blutdruck und eine erhöhte Agonist-induzierte Kontraktilität von isolierten Aortenringen festgestellt. Höhere basale Kationenströme und ein vermindertes Membranpotential wurden auch in glatten Gefäßmuskelzellen von TRPC6^{-/-}-Mäusen gefunden (Freichel et al., 2005). Jener Effekt konnte durch eine induzierte TRPC3 siRNA komplett beseitigt werden. Dies zeigt, dass Ca²⁺-Ströme durch TRPC3-Kanäle bei TRPC6^{-/-}-Mäusen in Zellinnere gelangen, aber auch, dass TRPC3 nicht komplett den Platz von TRPC6 einnehmen kann. Auch Diedrich (2005) vermutete, dass TRPC6 den Gefäßmuskeltonus kontrolliert und eine regulierende Untereinheit für die Basalaktivität von TRPC3 sein könnte. Lis (2005) mutmaßte ebenfalls, dass ein TRP-Kanal die funktionale Wirksamkeit eines TRP-Kanalkomplexes modulieren könnte, welches für die Hypothese von TRPC6 als regulatorische Untereinheit und bei Verlust dieser zum anschließenden Ca²⁺-Einstrom durch TRPC3 sprechen würde.

Dass TRPC3 für die Kalziumhomöostase von Bedeutung ist, zeigte Lui (2005), wobei in seinen Untersuchungen in Zellen von spontan hypertensiven Ratten die erhöhte Expression von TRPC3 mit einem erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel einherging. Kwan (2004) konnte die Bedeutung von TRPC3 für die Kalziumhomöostase in HEK-Zellen darstellen. So kommt es bei einer Überexpression von TRPC3 in Kalzium-haltigem Medium zu einem erhöhten Kalziuminflux.

Es also wäre weiterhin möglich, dass nicht nur eine verminderte Regulation des Heteromultimerkomplexes zum Kalziumeinstrom führt, sondern auch eine vermehrte Aktivierung von TRPC3. Die Aktivierung von TRPC3 könnte durch eine mögliche Signalkaskade von statten gehen, die ihren Ausgangspunkt in der Aktivierung von Phospholipasen hat. Durch die Tatsache, dass die Arbeitsgruppe von Jackson (1985) in Muskeln von DMD-Patienten eine erhöhte Aktivität der Phospholipase A fanden, scheint dieser Ansatz denkbar. Im Allgemeinen katalysieren aktivierte Phospholipasen die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat zu Inositol-1, 4, 5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG).

DAG kann nun an plasmamembranständige Ionenkanäle binden (Clapham, 2003; Pedersen et al., 2005). TRPC3 besitzt eine solche Bindungsstelle für DAG am zytosolischen C-Terminus (Clapham, 2003; Pedersen et al., 2005). Es wird spekuliert, das TRPC3 durch DAG konstitutiv aktiv wird (Pederson et al., 2005) und so noch weitere Kalziumionen aus dem Extrazellularraum ins Zellinnere gelangen können.

Überdies besitzt TRPC3 auch eine Bindungsstelle für den IP₃-Rezeptor (IP₃-R) (Clapham, 2003; Pedersen et al., 2005) und kann durch diesen aktiviert werden (Kwan et al., 2004). Das freigesetzte IP₃ wandert an den IP₃-R und stimuliert in Verbindung mit TRPC3 die Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern (Kiselyou et al., 2000; Kwan et al., 2004; Zhu, 2005). Bei Ca²⁺-Einstrom nach Stimulation werden normalerweise die Kalziumionen in der Zelle durch Kalzium-puffernde Proteine wie Calmodulin (CaM) gebunden. TRPC3 besitzt ebenfalls eine CaM-Bindungsstelle, welche mit der von IP₃-R überlappt (Kwan et al., 2004; Zhu, 2005). Calmodulin, mit Kalzium beladen, ist normalerweise in der Lage den IP₃-R aus seiner Verbindung zu drängen und TRPC3 zu inaktivieren (Kwan et al., 2004). Der pathologisch erhöhte Kalziumspiegel bei Dystrophin-defizienten Muskeln könnte mit der vermehrten Aktivierung von TRPC3 an den intrazellulären Speichern oder einer gestörten Rückkopplung in Verbindung stehen. Vandebrouck (2002) und Basset (2006) berichteten von einem erhöhten Grundlevel von IP₃ und IP₃-Rezeptoren in mdx-Myotuben, wodurch eine vermehrte Aktivierung von TRPC3 zustande kommen könnte. So fand Zhu (2005) heraus, dass eine erhöhte Konzentration von IP₃ dazu führt, dass CaM auch bei hoher intrazellulärer Kalziumkonzentration nicht an TRPC3 gebunden und daher möglicherweise die Rückkopplung in mdx-Muskelzellen gestört wird.

Weiterhin führt eine Verminderung von Kalzium-speichernden Proteinen zu einer erhöhten Basalaktivität von TRPC3, was Trebak (2003) in CaM-Mutanten beschreiben konnte. Auch Kalzium-puffernde Enzyme wie Povalbumin (PV) sind von Bedeutung. Rüdell und Brinkmeier (2002) schilderten, dass PV-„knock-out“-Mäuse einen deutlichen Kraftverlust und eine histologisch schneller fortschreitende Pathologie als die mdx-Maus aufwiesen. Es ist auch wahrscheinlich, dass die Herabsetzung der luminalen Pufferkapazität für Ca²⁺ mit einer Verminderung des Proteins Namens Sarcalumenin (SAR) einhergeht und somit die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels begünstigt (Berchtold et al., 2000). Bestätigt werden könnte dies auch durch Funde von Berchtold (2000) und Dowling (2004), wobei in Dystrophin-defizienten Muskelfasern das Protein SAR um ca. 70 % reduziert ist. Die Minderung dieser Proteine bewirkt eine weitere Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels.

Es wäre weiterhin denkbar, dass die Dystrophin-defiziente Zelle sensibler auf Stressreize reagiert und es daher zusätzlich zum Kalziumeinstrom kommt. Kieselyou (2005) berichtete, dass die indirekte Antwort auf Stress in der Zelle durch die Synthese eines Proteins namens Homer 1a vermittelt wird und es dadurch zur erhöhten Interaktion von TRPC3 und dem IP₃-Rezeptor sowie daraus folgend zur Aktivierung von TRPC3 kommt. Überdies wäre der erhöhte Kalziumeinstrom noch durch eine weitere Theorie erklärbar. In den Lokalisationsanalysen von TRPC3 wurde dieser Ionenkanal in mdx-Mäusen mehr intrazellulär als sarkolemmal gefunden. Vermutlich führt die Verschiebung der Heteromultimerkomplexe an intrazelluläre Membranen vermehrt zu Bindungsstellen für den IP₃-R. Bei Interaktion mit TRPC3 könnte es zur zusätzlichen Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern kommen.

Eine Besonderheit in der Expression der TRPCs in mdx-Mäusen stellt möglicherweise TRPC5 dar. Die mRNA dieses Ionenkanals wurde in der vorliegenden Analyse zwar nur in geringen Mengen im Muskelgewebe nachgewiesen, aber es zeigten sich beim Vergleich zu den Kontrolltieren in den mdx-Mäusen signifikante Erhöhungen der mRNA Expressionen, besonders bei jungen Tieren.

Bisher konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte extrazelluläre Kalziumkonzentration und ein bescheidener Anteil an Ca²⁺-Ionen im Intrazellularraum zu einem Kalziumeinstrom durch membranständige TRPC5-Kanäle führt (Pedersen et al., 2005).

Durch die Kalziumpermeabilität (Plant und Schaefer, 2005) ist die vermehrte Expression von TRPC5 im Anfangsstadium der pathologischen Prozesse von besonderem Interesse. Zu Beginn des Krankheitsverlaufes konnte bereits eine erhöhte Aktivität von Phospholipasen dokumentiert werden. Die Phospholipase-C aktiviert aber auch TRPC5, was bei jungen mdx-Mäusen zunächst zu einem erhöhten Kalziumeinstrom führen könnte. Eine Bestätigung dieser Annahme würde sich in Arbeiten von Schaefer (2000) finden, wobei eine Überexpression von TRPC5 einen höheren basalen Kalziuminflux nach sich zog. Der Anstieg der TRPC5-mRNA stellt wahrscheinlich die Ursache für einen erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel in jungen mdx-Muskelfasern dar, zumal der Ca²⁺-Gehalt bei 30 d alten mdx-Mäusen noch nicht stark erhöht ist (Rüdel und Brinkmeier, 2002). Durch den Kalziumeinstrom könnten weitere Proteasen aktiviert und die bereits zuvor beschriebene Kaskade mit nachfolgendem vermehrten Kalziumeinstroms durch TRPC3 ausgelöst werden. Okada (1998) vermutete bereits, dass TRPC5 in Mechanismen involviert ist, welche TRPC3 aktivieren.

Des Weiteren berichtete Kiselyov (2005), dass ein Protein namens Enkurin für die Translokation von TRPC5 an die Plasmamembran verantwortlich ist. Es wäre möglich, dass in Dystrophin-defizienten Fasern dieses Protein vermehrt gebildet wird und mit TRPC5 interagiert, so dass dieser Ionenkanal ans Sarkolemm befördert wird und es zum Kalziumeinstrom kommt. Diese Theorie könnte auch dadurch wahrscheinlich sein, da gleichzeitig gefunden wurde, dass die Insertion von TRPC5 in die Plasmamembran nur in Gegenwart von Wachstumsfaktoren stimuliert wird. Solche Wachstumsfaktoren wurden in mdx-Muskelzellen vermehrt nachgewiesen (Rouger et al., 2002). Da im Anfangsstadium der Krankheit der Regenerationszyklus beginnt und Wachstumshormone freigesetzt werden, wäre es möglich, dass dadurch bedingt TRPC5 sekundär aktiviert wird. Es ist sehr wahrscheinlich, dass TRPC5 am Anfang der Pathologie der Duchenne Muskeldystrophie und für die veränderte Kalziumhomöostase in Dystrophin-defizienten Fasern von Bedeutung ist.

Die Analyse der TRPV-Familie zeigte, dass nur TRPV4 auf dominierendem Level im Muskelgewebe exprimiert wurde und alle anderen Vertreter eine eher untergeordnete Rolle spielen (Kunert-Keil et al., 2006). Da eine Expression von TRPV4 in HEK-Zellen zu einem erhöhten basalen Kalziumspiegel führt (Strotmann et al., 2000; Vriens et al., 2003), war dieser Ionenkanal in Bezug auf den erhöhten Kalziumspiegel in mdx-Mäusen von Interesse. TRPV4 zeigte in der vorliegenden Analyse im Vergleich zu Kontrolltieren aber zu keinem Zeitpunkt relevante Veränderungen in der Expression in den mdx-Mäusen. Mutmaßlich geht der erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel nicht mit einer Expression von TRPV4 einher.

Dass TRPV4 dennoch von Bedeutung für Dystrophin-defiziente Fasern sein könnte, zeigen folgenden Tatsachen. So ist dieser Ionenkanal ca. sechsmal besser für Kalzium leitfähig als für Natrium ($P_{Ca^{2+}} / P_{Na^{+}} = 6 - 10$) (Vriens et al., 2003; Nilius et al., 2004). Außerdem konnte in unseren Untersuchungen TRPV4 im Muskelgewebe nicht nur nachgewiesen, sondern auch sarkolemmal lokalisiert werden. Die sarkolemmale Lokalisation wird unterstützt durch die Funde, dass TRPV4 Kalziumionen aus dem Extrazellularraum ins Zellinnere durchlässt (Strotmann et al., 2000; Moran et al., 2004). Im Muskelgewebe dient TRPV4 wahrscheinlich als Dehnungs-aktivierter Ionenkanal, welcher bei erhöhter mechanischer Belastung aktiviert wird (Voets et al., 2002; Vriens et al., 2003; Liedtke, 2005). Die wichtige Rolle von TRPV4 wird durch eine erhöhte Aktivität von mechanosensitiven Ionenkanälen in mdx-Myotuben deutlich (Lansman und Franco-Obregon, 2006). Demnach ist die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle in mdx-Myotuben höher und Kalziumionen könnten, trotz unveränderter Expression ins Zellinnere gelangen.

Das mechanischer Stress den dystrophischen Prozess deutlich verschlimmert (Rüdel und Brinkmeier, 2002), ist ein Indiz für die Aktivierung von TRPV4. Lansman und Franco-Obregon (2006) vermuteten gar, dass eine Dysfunktion der Regulationsmechanismen der mechanosensitiven Kanäle in einer frühen Stufe des pathologischen Prozesses zu einem vermehrten Kalziumeinstrom führt.

Andere Arbeitsgruppen (Voets et al., 2002; Liedtke, 2005; Liedtke und Kim, 2005; Nilius et al., 2004; Moran et al., 2004; Cohen, 2005) betrachteten TRPV4 auch als osmosensitiven Ionenkanal. TRPV4 zeigt ein Maximum an Ca^{2+} -Einstrom bei einer physiologischen Körpertemperatur von 37 °C (Liedtke, 2005). Die Arbeitsgruppe um Nilius (2004) und Pederson (2005) bezeichneten TRPV4 bei Körpertemperatur sogar als konstitutiv offen und ordneten ihm eine mögliche Bedeutung in der Kalziumhomöostase zu.

Da TRPV4 normalerweise durch hohe intrazelluläre Kalziumionen inhibiert wird, wäre es auch wahrscheinlich, dass dieser negative Rückkopplungs-Mechanismus bei den DMD-Patienten und der mdx-Maus nicht mehr oder nur eingeschränkt vorhanden ist, so dass die Kalziumionen weiterhin ins Zellinnere gelangen können. Unterstützt wird diese Annahme durch Berichte von einer Mutation im sechsten transmembranen Segment von TRPV4, welches eine verringerte Inaktivierung durch intrazelluläre Kalziumionen zur Folge hatte (Nilius et al., 2004).

Allgemein scheint aber TRPV4 nur für einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom bei mechanischer Belastung verantwortlich zu sein, wodurch der pathologische Prozess noch verstärkt wird.

Für einen erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel in mdx-Mäusen könnten aber auch noch andere Ionenkanäle, so Vertreter aus der TRPM-Familie, in Frage kommen. In unseren Analysen konnten wir erstmals zeigen, dass die mRNA von TRPM1 in verschiedenen Muskelgeweben exprimiert wird. Beim Vergleich gegenüber Kontrolltieren fiel TRPM1 durch eine deutlich vermehrte mRNA Expression im Muskelgewebe von adulten mdx-Mäusen auf.

TRPM1 wurde ursprünglich in Melanomzellen entdeckt (Fleig und Penner, 2004; Lis et al., 2005) und ist hoch exprimiert in nicht metastasierten Zellen sowie stark reduziert in metastasierten Zellen (Fleig und Penner, 2004; Lis et al., 2005; Pederson et al., 2005). In den biophysikalischen Eigenschaften ist TRPM1 noch nicht weiter charakterisiert (Fleig und Penner, 2004; Lis et al., 2005). Bekannt ist jedoch, dass es zwei humane Spleißvarianten gibt, wobei eine Überexpression der kurzen Variante in Testzellen Kalziumströme ins Zellinnere vermittelt (Lis et al., 2005). Das TRPM1 Kalziumionen ins Zellinnere befördern kann oder den intrazellulären Kalziumspiegel durch unbekannte Mechanismen erhöht, wurde durch Fleig (2004) beschrieben, wobei HEK-Zellen, welche TRPM1 exprimierten, eine höhere intrazelluläre Kalziumkonzentration aufwiesen.

Die Überexpression in mdx-Mäusen und die Kalziumselektivität machen TRPM1 für unsere Betrachtungen interessant.

Es wäre denkbar, dass TRPM1 zu den „*growth factor-regulated channels*“ gehören könnte. Iwata (2003) spekulierte, dass „*growth factor-regulated channels*“ zu den TRP-Kanälen gehören und im Sarkolemm von mdx-Muskelfasern erhöht sind. Da in Gewebeschnitten von mdx-Mäusen undifferenzierte Zellen in den Regenerationszyklen beobachtet wurden, ist es möglich, dass Wachstumsfaktoren deren Reifung und Fusion zu Muskelfasern initiieren sollen. Es besteht die Wahrscheinlichkeit, dass diese Wachstumsfaktoren, z. B. den „*insulin-like growth factor*“-1 (IGF-1) (Allen et al., 2005), die vermehrte Expression von TRPM1 in mdx-Muskelzellen stimulieren. Bestätigt werden würde diese Vermutung durch Berichte, nach denen in Dystrophin-defizienten Muskeln eine erhöhte Aktivität von IGF-1 (Berchtold et al., 2000) und IGF-2 (Rouger et al., 2002) beschrieben wurden. TRPM1 wurde weiterhin als Tumorsuppressor betrachtet (Lis et al., 2005), woraus sich vermuten lässt, dass eine verminderte Expression ein unkontrolliertes Wachstum von Zellen nach sich zieht und umgekehrt, die Stimulation von TRPM1 durch IGF-1 zu einer Differenzierung führt.

Dies könnte die dargelegte Hypothese bestätigen und somit einen zusätzlichen Kalziumeinstrom durch TRPM1 in Dystrophin-defiziente Muskelfasern hervorrufen. Eine weitere Bekräftigung der aufgestellten Theorie erfolgt durch Arbeiten von Lis (2005). Die Arbeitsgruppe wies in humanen SK-Mel-19 Melanozyten nach Induktion der Zelldifferentiation eine Hochregulation von TRPM1 nach. Sollte die aufgestellte Hypothese zutreffend sein, so könnte dies bedeuten, dass eine stimulierte Expression von TRPM1 möglicherweise ein unkontrolliertes Zellwachstum verhindert, welches auch bei der Krebstherapie von Bedeutung ist. Fleig und Penner (2004) vermuteten bereits, dass TRPM1 als prognostischer Marker für Metastasenbildung eingesetzt werden kann.

Die erhöhte Expression von TRPM1 in Muskelgeweben von mdx-Mäusen könnte aber auch mit der vermehrten Ansammlung von Fett- und Bindegewebe im Zusammenhang stehen. Da dies vor allem in alten mdx-Mäusen geschieht, korreliert die erhöhte mRNA von TRPM1 in direkter Weise damit und ist eventuell ein Marker für den fortschreitenden nekrotischen Prozess. Wahrscheinlicher ist jedoch die erstere Hypothese, wobei ein zusätzlicher Kalziumeinstrom durch die vermehrte Bildung von TRPM1 verursacht werden könnte und es zu einer Verstärkung des fortschreitenden nekrotischen Prozesses kommt.

Für die Duchenne Muskeldystrophie ist aber möglicherweise eher ein weiterer Ionenkanal der TRPM-Familie, nämlich TRPM7, von Bedeutung. TRPM7 stellte in unseren Analysen mit einer mehr als 10-fach stärkeren Expression gegenüber allen anderen TRP-Kanälen den dominantesten Vertreter im Muskelgewebe dar (Kunert-Keil et al., 2006).

Er ist ein kalziumpermeabler, nicht-selektiver Kationenkanal, welcher vorrangig Mg^{2+} , aber eben auch Ca^{2+} und zweiwertige Schwermetallionen leitet (Hanano et al., 2004; Fleig und Penner, 2004). Dieser Ionenkanal besitzt eine Kinase-Domäne, welche möglicherweise die Öffnung des Kanals kontrolliert (Fleig und Penner, 2004; Pederson et al., 2005). TRPM7 kann mit TRPM6 einen Heteromultimer-Komplex bilden, wobei TRPM6 für eine Lokalisation in der Plasmamembran benötigt wird (Pederson et al., 2005). Die Dominanz, die Kalziumselektivität und die sarkolemmale Lokalisation machen TRPM7 möglicherweise einflussreich in Bezug auf einen erhöhten Kalziumspiegel.

Unsere Analysen zeigten weiterhin, dass die Expression dieses Ionenkanals sich drastisch mit zunehmendem Alter der Tiere reduzierte, wodurch die Vermutung aufkommt, dass dies ein Zeichen des natürlichen Alterungsprozesses darstellt. Fleig und Penner (2004) schilderten, dass durch reaktiven Sauerstoff TRPM7 hochreguliert wird. Vermutlich werden dadurch die negativen Einflüsse der Radikale gemildert. Es liegt nahe, dass die Reduktion von TRPM7 zu einer verminderten Widerstandsfähigkeit der Zellen gegen oxidativen Stress führt. Die verringerte Expression von TRPM7 scheint ursächlich mit dem Zelltod einherzugehen (Moran et al., 2004; Pederson et al., 2005). Dieser Theorie liegen Analysen mittels TRPM7-„knockout“-Zellen zugrunde, wobei in diesen Zellen ein gestörtes Zellwachstum und eine verminderte Viabilität (Fleig und Penner, 2004; Freichel et al., 2004) gefunden wurde. Mutationen von TRPM7 in Zebrafischen führten zu Störungen des Wachstums und der Skeletogenese (Pederson et al., 2005).

Diese Tatsachen und die Dominanz von TRPM7 im Muskelgewebe sind wahrscheinlich für den pathologischen Prozess der Dystrophindefizienz wichtig.

Im Vergleich zu Kontrolltieren fanden wir in unseren Analysen eine deutliche Reduktion der Expression von TRPM7 in mdx-Mäusen.

Da TRPM7 hauptsächlich Mg^{2+} leitet (Fleig und Penner, 2004) und bei DMD-Patienten ein tendenziell verringerter zytosolischer Magnesiumgehalt gefunden wurde (Bertorini et al., 1984; Jackson et al., 1985), könnte dies unter anderem den Zelltod bei verringerter TRPM7 Expression sowohl bei älteren Tieren, als auch bei mdx-Mäusen verursachen.

Da TRPM7 unter anderem durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration aktiviert wird (Fleig und Penner, 2004), könnte die Reduktion von TRPM7 in mdx-Mäusen durch ein Gegenregulationsphänomen der Zelle zustande kommen, um den Einstrom von weiteren Kalziumionen in die Zelle zu verhindern. Im Gegensatz dazu schilderte Zhu (2005), dass CaM eine verminderte Aktivierung der Kinase bewirkt. Dies zieht eine verringerte Aktivität der TRPM7-Pore nach sich, wodurch mutmaßlich eine direkte Antwort auf den erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel erfolgt.

Beide Signaltransduktionswege führen zu einer Reduktion von TRPM7. Möglicherweise kommt es infolgedessen zu einer gestörten Magnesiumunterversorgung im Muskelgewebe und daraufhin über weitere Mechanismen zum Zelltod.

Für die eigentliche Ca^{2+} -Überladung der Muskelfasern scheint TRPM7 aber nicht verantwortlich zu sein.

In die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels in Dystrophin-defizienten Fasern sind vermutlich mehrere Mechanismen involviert. Ein weiterer Kationenkanal, welcher in unseren Analysen eine veränderte Expression in mdx-Mäusen aufwies, war TRPA1. Der Ionenkanal TRPA1 wurde erst kürzlich der TRP-Superfamilie zugeordnet (Pederson et al., 2005). Bisher wurde er als „*rezeptor-operated channel*“ beschrieben und ist für die Mechanotransduktion im Gehör sowie als Thermosensor von Bedeutung. TRPA1 wird auch durch verschiedene chemische Substanzen stimuliert, wie z.B. durch die scharfe Komponente des Senföls Isothiocyanat oder auch die psychoaktive Komponente in Marihuana, Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) (Moran et al., 2004; Montell, 2005; Pederson et al., 2005). Weiterhin wird dieser Ionenkanal als nicht-selektiver Kalzium-leitender und spannungsunabhängiger Kationenkanal betrachtet (Clapham, 2003; Calixto et al., 2005), wodurch er auch in Bezug auf den erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel in den Muskelfasern der mdx-Maus von Interesse war.

In unseren Analysen zeigte TRPA1 in allen Muskelgeweben von Kontrollmäusen eine konstant geringe Expression. Im Vergleich dazu wurde in eine signifikant erhöhte mRNA Expression von TRPA1 bei adulten mdx-Mäusen nachgewiesen.

Da dieser Ionenkanal noch nicht ausreichend erforscht ist, bleibt der Zusammenhang der erhöhten TRPA1-mRNA in mdx-Mäusen und der Dystrophindefizienz spekulativ.

Die Ansammlung von Fett- und Bindegewebe in den Muskelfasern von alten mdx-Mäusen könnte über unbekannte Mechanismen zu einer gesteigerten Expression von TRPA1 führen, welcher dann ein möglicher Marker für den dystrophischen Prozess in der mdx-Maus darstellt.

Da die Muskelzellen von adulten Mäusen unter Energiemangel leiden (Rouger et al., 2002) und die aktivierte Form von TRPA1 ein vermutlich energieärmerer Zustand ist (Clapham, 2003), wäre es hypothetisch möglich, dass TRPA1 aufgrund von Energiemangel zur offenen Konformation übergeht. Dadurch würden zusätzlich Kalziumionen ins Zellinnere gelangen und den dystrophischen Prozess in alten mdx-Mäusen verstärken.

Einem weiteren Ansatz für eine Erklärung der vermehrten TRPA1-mRNA in adulten Mdx-Mäusen liegen Arbeiten von Calixto (2005) zugrunde. Er beschrieb, dass eine Überexpression von TRPA1 in eukaryotischen Zellen das normale Wachstum stört. Hypothetisch gesehen könnte die erhöhte Expression dieses Ionenkanals in adulten mdx-Mäusen die Heranreifung von undifferenzierten Zellen zu Muskelfasern verhindern und so den Regenerationsprozess stören. Die Dysfunktion des Regenerationsprozesses, gerade bei alten mdx-Mäusen, würde bedeuten, dass TRPA1 vermutlich für den Funktionsverlust der Dystrophin-defizienten Muskulatur mitverantwortlich ist. Ob dies durch einen vermehrten Kalziumeinstrom initiiert wird, die Kalziumionen als Sekundäreffekt durch diesen Ionenkanal ins Zellinnere gelangen oder ob TRPA1 für die veränderte Kalziumhomöostase in mdx-Mäusen keine Relevanz darstellt, ist jedoch noch nicht erforscht.

Neben den TRP-Kationenkanälen, welche möglicherweise für den erhöhten Kalziumeinstrom in Dystrophin-defizienten Muskeln verantwortlich sind, könnten aber auch andere Kanäle, welche keine Kalziumionen leiten, für die Pathologie der mdx-Maus von Bedeutung sein.

Im Zuge unserer Analysen wurde die mRNA Expression des muskelspezifischen spannungsgesteuerten Natriumkanals SCN4A als mögliche Referenz mit analysiert, da dieser Ionenkanal im mdx-Mäusen unverändert exprimiert sein sollte (Ribaux et al., 2001). Demzufolge war eine starke Expression im Muskelgewebe von Kontrollmäusen zu erwarten, jedoch nicht, dass dieser Ionenkanal im Muskelgewebe von mdx-Mäusen drastisch auf ca. 1/6 reduziert nachgewiesen wurde. Da für beide Analysen die gleichen Mausstämme genutzt wurden und die RNA-Isolierung in gleicher Art und Weise erfolgte, können die Unterschiede in den verwendeten Primern liegen. Während Ribaux (2001) zur Primersynthese Sequenzen der Ratte und zur Amplifizierung nur die Standard RT-PCR benutzte, wurden für unsere Analysen spezifischere Primer sowie die qualitativ und quantitativ sensitivere Methode der „*Real-time*“ RT-PCR verwendet, wobei eine eindeutige Reduzierung der SCN4A-mRNA im Muskelgewebe von 30 d und 100 d alten mdx-Mäusen nachgewiesen wurde. Unsere Analysen zeigten weiterhin, dass in sehr alten Kontrollmäusen ebenfalls eine Reduktion von SCN4A erfolgte und auf gleichem Level wie in mdx-Mäusen lag.

Erklären lässt sich letzteres Resultat durch einen natürlichen Fasertypwechsel von schnellen Typ-II-B-Muskelfasern zu langsamen Typ-IIA-Muskelfasern im Alterungsprozess (Berchtold et al., 2000), wobei die langsamen Typ-IIA-Muskelfasern vermutlich weniger SCN4A aufweisen. Die reduzierte SCN4A-mRNA in jungen mdx-Mäusen beruht dann womöglich auf einem frühzeitig erfolgenden Fasertypwechsel.

Bestätigt wird diese Hypothese durch Arbeiten von Tutdibi (1999), welcher solchen Muskelfasertypwechsel in mdx-Mäusen beobachtete. Somit stellt der verringerte Anteil an SCN4A-mRNA vermutlich eine Art Grundlevel dar, welcher für die minimale Muskelfunktion benötigt wird, aber keine extremen Belastungen ermöglicht. Dies würde übereinstimmen mit der Tatsache, dass mdx-Mäuse zwar normal laufen können, aber eine schnellere Ermüdbarkeit zeigen (Berchtold et al., 2000).

Eine Erklärung für den erfolgenden Fasertypwechsel in mdx-Mäusen wäre vielleicht der vorliegende Energiemangel in den Muskelzellen. So wurde in den Hinterbeinmuskeln von mdx-Mäusen eine herunter Regulation der NADH-DHG, des Glukosetransporters und der Pyruvatkinase gefunden (Rouger et al., 2002). Dadurch wird eventuell die ATP-Synthase beeinträchtigt, was zu einer veränderten metabolischen Versorgung führt, welches ebenfalls in Muskelermüdung und Muskelschwäche resultiert.

Die Reduktion von SCN4A in mdx-Mäusen könnte auch einem erhöhten intrazellulären Natriumspiegel in mdx-Muskeln zugrunde liegen (Jackson et al., 1985; Allen et al., 2005). Möglicherweise sind die dafür verantwortlichen Ionenkanäle modifiziert und haben eine höhere Offenwahrscheinlichkeit (Allen et al., 2005). Der Einstrom von Natriumionen könnte gegebenenfalls eine Erhöhung des Membranpotentials zu positiveren Werten bewirken. Jenes würde möglicherweise zu einer verminderten Expression von spannungsabhängigen Natriumkanälen führen, da diese nur noch in geringerer Zahl benötigt werden. In gleichem Maße wäre es wahrscheinlich, dass auch einige spannungsabhängige Kalziumkanäle aktiviert werden, wodurch es zum Kalziumeinstrom in die mdx-Muskelfasern kommen kann.

Dennoch scheint SCN4A für die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels keine Rolle zu spielen. Dieser Ionenkanal ist aber möglicherweise für andere Prozesse im Zusammenhang mit der Dystrophindefizienz bedeutend.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die mRNA Expressionen aller spannungsunabhängigen Kationenkanäle in Kontroll- und mdx-Mäusen analysiert. Es zeigte sich, dass im Muskelgewebe die Mitglieder der DEG/ENaC-Familie keine relevante Expression vorwiesen, während TRPC3, TRPC6, TRPV4 und TRPM7 dominierend exprimiert waren. Von diesen Ionenkanälen zeigten TRPC6 und TRPM7 eine verringerte Expression in mdx-Mäusen. Während die Reduktion von TRPC6 und eine verstärkte Aktivierung von TRPC3 wahrscheinlich zu einem vermehrten Kalziumeinstrom führen und somit den intrazellulären Kalziumspiegel erhöhen, scheint TRPM7 eher für den frühen Zelltod der Muskelfasern in mdx-Mäusen maßgeblich zu sein.

TRPV4 ist möglicherweise in Bezug auf die Anfälligkeit der Dystrophin-defizienten Muskelfasern auf mechanischen Stress von Bedeutung, wodurch wahrscheinlich noch zusätzliche Kalziumionen ins Zellinnere gelangen und den dystrophischen Prozess verstärken. Unsere Analysen zeigten weiterhin, dass eventuell TRPC5 für den Kalziumeinstrom zu Beginn der Erkrankung verantwortlich ist. Dieser Kationenkanal ist selektiv für Kalziumionen und wurde in sehr jungen mdx-Mäusen signifikant höher exprimiert. Hypothetisch könnte dadurch der Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels auf ein erhöhtes Level erfolgen und somit weitere Prozesse auslösen, welche zu einem pathologischen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels und zum Zelltod führen.

Weitere Analysen der, für den erhöhten Kalziumspiegel möglicherweise verantwortlichen Kationenkanäle, könnten Ansätze für eine Reduzierung des intrazellulären Kalziumspiegels in Dystrophin-defizienten Fasern bieten. Somit könnten gegebenenfalls die sekundären pathologischen Erscheinungen der Dystrophindefizienz und die Progredienz der Duchenne Muskeldystrophie gemildert werden.