

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
(Direktorin: Prof. Dr. med. J. Gärtner)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Untersuchungen zum Einfluss der  
Dysferlindefizienz auf den speichergesteuerten,  
transsarkolemmalen Kalziumstrom und  
triadenassoziierte Proteine im murinen  
Skelettmuskel**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Ronja Maxi Büssenschütt**

aus Bremen

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent:	Priv.-Doz. Dr. med. L. Klinge
Ko-Referentin:	Prof. Dr. Katrin Streckfuß-Bömeke
Drittreferent:	Prof. Dr. Tobias Brüggemann

Datum der mündlichen Prüfung: 24.11.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Untersuchungen zum Einfluss der Dysferlindefizienz auf den speichergesteuerten, transsarkolemmalen Kalziumstrom und triadenassoziierte Proteine im murinen Skelettmuskel" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 24.11.2021

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

**Hofhuis J**, Bersch K, Büssenschütt R, Drzymalski M, Liebetanz D, Nikolaev VO, Wagner S, Maier LS, Gartner J, Klinge L, Thoms S (2017): Dysferlin mediates membrane tubulation and links T-tubule biogenesis to muscular dystrophy. *J Cell Sci* 5, 841–852

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Grundlagen .....	2
1.1.1 Muskelformen.....	2
1.1.2 Aufbau der Skelettmuskulatur .....	3
1.1.3 Triadenproteine.....	7
1.1.4 Kalzium im Skelettmuskel.....	8
1.1.4.1 ECC und CICR .....	8
1.1.4.2 Ryanodin/- DHPR Komplex.....	9
1.1.4.3 Mitsugumin29 (MG29 oder SYPL2).....	10
1.1.4.4 Bin1 (Amphiphysin2) .....	11
1.1.4.5 Caveolin3.....	12
1.1.4.6 Mitsugumin53 (MG53, TRIM72).....	13
1.1.4.7 Junctophilin (JP).....	13
1.1.4.8 TRPC3 (transient receptor potential channel) .....	14
1.1.5 Speichergesteuerte Kalziumströme (SOCE).....	14
1.1.5.1 Mitsugumin29 (MG29).....	17
1.1.6 Hinausschleusen von Kalzium aus dem Sarkoplasma .....	17
1.1.6.1 SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase) .....	17
1.1.6.2 PMCA (plasma membrane calcium-ATPase).....	17
1.1.6.3 NCX (Natrium/ Kalziumaustauschkanäle) .....	18
1.1.7 Muskeldystrophien .....	18
1.1.8 Die Rolle der Kalziumhomöostase .....	18
1.1.9 Dysferlin .....	20
1.2 Fragestellung .....	24
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.1 Kalziumstrommessungen am Epifluoreszenzmikroskop.....	26
2.1.1 Mausmodelle .....	26
2.1.2 Lösungen und Material.....	26
2.1.3 Fluoreszenz-Setup .....	28

2.1.4	Isolation von Skelettmuskelzellen .....	28
2.1.5	Messung des transsarkolemmalen Kalziueinstroms .....	29
2.2	Quantitative <i>real time</i> PCR.....	31
2.2.1	Extraktion der RNA.....	32
2.2.2	Herstellung der cDNA .....	33
2.2.3	Ablauf der qPCR .....	34
2.3	Immunfluoreszenzen .....	36
2.3.1	Material für die Immunfluoreszenzen .....	36
2.3.2	Kultivierung der FDB Fasern .....	38
2.4	Statistische Analysen.....	39
2.5	Eigene Zeichnungen und Tabellen .....	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
3.1	Messungen des transsarkolemmalen Kalziueinstroms .....	40
3.1.1	Die Dysferlindefizienz führte nicht zu einem signifikant erhöhten transsarkolemmalen Kalziueinstrom in die dysferlindefiziente murine Muskelzelle...	41
3.2	Quantitative <i>real time</i> PCR.....	44
3.2.1	Dysferlin beeinflusste die RNA-Expression von Junctophilin1 und STIM1.....	45
3.3	Analyse der Triadenproteinexpression im murinen Skelettmuskel anhand von Immunfluoreszenzen .....	46
3.3.1	Dysferlin beeinflusste das Fluoreszenzmuster von Junctophilin1 und Orai1 im murinen Skelettmuskel .....	47
3.3.2	Lokalisation von Junctophilin1 ist in Dysferlin-knockout-Muskelzellen unverändert in Kofärbung mit RyR1 .....	48
3.3.3	Dysferlin kolokalisierte mit RyR1 entlang der Triaden.....	49
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>51</b>
4.1	Der Einfluss von Dysferlin auf die Kalziumhomöostase.....	51
4.1.1	Speichergesteuerter, transsarkolemmaler Kalziumstrom (SOCE).....	51
4.1.2	Excitation contraction coupling (ECC) .....	54
4.1.3	Wiederaufnahme von Kalzium aus dem Sarkoplasma .....	55
4.2	Triadenformation .....	57
4.2.1	Dysferlindefizienz vermindert die Expression von Junctophilin1 .....	58
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>65</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AD	autosomal dominant
ADP	Adenosindiphosphat
AR	autosomal rezessiv
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BTS	N-Benzyl-p-toluenesulfonamide
C2C12	Myoblasten Zelllinie von der Maus
CICR	<i>calcium-induced calcium release</i>
CK	Kreatinkinase
cRNA	<i>complementary ribonucleic acid</i>
CSQ	Calsequestrin
C <sub>T</sub>	<i>threshold cycle</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHPR	Dihydropyridin-Rezeptor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECC	<i>excitation contraction coupling</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FDB	Flexor Digitorum Brevis
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazinyl)-1-ethansulfonsäure
JP	Junctophilin
KO	Knockout
LGMD	<i>limb girdle muscular dystrophy</i>
Mdx	<i>murine X chromosome-linked muscular dystrophy</i>
MG29	Mitsugumin29
MG53	Mitsugumin53
MHC I/II	<i>major histocompatibility complex I/II</i>
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
MM	Miyoshi-Myopathie

---

mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mV	millivolt
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PMCA	<i>plasma membrane calcium-ATPase</i>
QF	Quadrizeps Femoris
qPCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RMD	<i>rippling muscle disease</i>
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SERCA	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SOCE	<i>store operated calcium entry</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STIM1	<i>stromal interaction molecule 1</i>
TAM	<i>tubular aggregate myopathy</i>
TRIM	<i>tripartite motif protein family</i>
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
UV-Licht	Ultraviolettstrahlung
WT	Wildtyp
XR	X-chromosomal rezessiv
ZTE	Zentralen Tierexperimentelle Einrichtung



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung quergestreifter Skelettmuskulatur.....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aktin-Myosinkomplexes.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Triadenproteine .....	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der speichergesteuerte Kalziumströme (SOCE) .....	16
Abbildung 5: Darstellung der Epifluoreszenzmessungen im murinen Skelettmuskel .....	30
Abbildung 6: Kalziumeinstrom muriner Dysferlin-knockout- versus Wildtyp-Muskelzellen.....	42
Abbildung 7: Kalziumeinstrom muriner Mdx- versus Wildtyp- Muskelzellen .....	44
Abbildung 8: RNA-Expression triadenassoziierter Proteine im murinen Dysferlin-knockout-Muskel im Vergleich zum Wildtyp-Muskel .....	46
Abbildung 9: Verändertes Fluoreszenzmuster im murinen Dysferlin-knockout-Muskel im Vergleich zum Wildtyp-Muskel für Junctophilin1 und Orai1 .....	48
Abbildung 10: Unveränderte Lokalisation von Junctophilin1 und RyR1 im Dysferlin-knockout- Muskel.....	49
Abbildung 11: Kolokalisation von Dysferlin und RyR1 im murinen Skelettmuskel.....	50

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Muskelfasertypen .....	3
Tabelle 2: Übersicht Muskeldystrophien .....	18
Tabelle 3: Übersicht der Versuchsgruppen .....	31
Tabelle 4: Übersicht der Primer .....	35
Tabelle 5: Zyklen der qPCR.....	36
Tabelle 6: Antikörper Immunfluoreszenzen .....	37
Tabelle 7: statistische Signifikanzniveaus .....	39

# 1 Einleitung

Körperliche Bewegung entsteht durch Abwechslung von Anspannung und Entspannung der Muskeln. Voraussetzung für eine muskuläre Anspannung ist die Fortleitung des Nervenpotentials und dessen Umwandlung in eine mechanische Kopplung, die zur temporären Verkürzung eines Muskels führt. Dieser Vorgang wird ermöglicht durch das Zusammenspiel einer Vielzahl von Proteinen der Muskulatur, die als Stützapparat, Rezeptoren und Ionenkanäle fungieren. Am Ende der Signalübertragung für die Muskelkontraktion folgt die Ausschüttung von Kalzium ins Zytoplasma der Muskelzelle. Dies führt zu einem Ineinandergreifen kleinster Muskelfilamente und zur mechanischen Verkürzung des Muskels. Die Entspannung der Muskulatur ist wiederum durch eine schnelle Wiederaufnahme von Kalzium in die im Muskel liegenden Kalziumspeicher bedingt. Muskelbewegung beruht demnach auf der adäquaten Veränderung der Kalziumkonzentration im Zytoplasma der Muskelzelle.

Muskeldystrophien sind erbliche Erkrankungen, bei denen es zu einem progredienten Verlust und Umbau der Muskulatur mit Schwäche und Atrophie kommt (Cohn und Campbell 2000). Bisher gibt es für diese Erkrankungen keine heilenden Therapiemöglichkeiten. Ursächlich sind genetische Defekte, die zu Funktionsverlust oder -einschränkung eines der Muskelproteine führen. Das Ausmaß der molekularen Folgen ist Gegenstand aktueller Forschung. Bekannte Auswirkungen sind unter anderem eine progrediente Instabilität insbesondere der Muskelfasermembran des Muskels durch Veränderungen der Expression und Interaktion assoziierter Proteine sowie eine Irregularität der Kalziumausschüttung der Muskelzelle (siehe 1.1.3, 1.1.7).

Neben vielen anderen Proteinen ist das Fehlen von Dysferlin als Ursache verschiedener Muskeldystrophien bekannt (Bashir et al. 1994 und 1998, Liu et al. 1998). Zu den Dysferlinopathien zählen die Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2B (engl.: *limb girdle muscular dystrophy, LGMD2B*), die Miyoshi-Myopathie (MM) und muskeldystrophische Erkrankungen mit isoliertem oder kombiniertem Befall einzelner proximaler und distaler Muskelgruppen (Bashir et al. 1994 und 1998, Liu et al. 1998, Illa et al. 2001). Weiter kann es bei einer Dysferlindefizienz zum Auftreten einer pseudometabolischen Myopathie mit Schwellung und Schmerzen der Muskulatur ohne Muskelschwäche oder einer asymptomatischen Kreatinkinase-Erhöhung kommen (Nguyen et al. 2007). Eine Besonderheit der Dysferlinopathien im Vergleich zu anderen Muskeldystrophien besteht in

ihrem klinischen Erscheinungsbild. Vor Beginn der progredienten Muskelschwäche zeichnen sich Patienten mit Dysferlinopathien durch überdurchschnittliche sportliche Aktivität aus (Klinge et al. 2010a). Die Pathogenese der Dysferlinopathien ist bislang nur ansatzweise verstanden. Bekannt ist bisher, dass Dysferlin zur Aufrechterhaltung und Bildung von Zellmembranen beiträgt (Klinge et al. 2010b, Selcen et al. 2001). Bei elektronenmikroskopischer Darstellung dysferlindefizienter Muskelzellen zeigen diese einen irregulären Aufbau der Membranstrukturen (Klinge et al. 2010b, Selcen et al. 2001). Zudem führt das Fehlen von Dysferlin zu einer fehlerhaften Reparatur nach Schädigung der Membran (Chiu et al. 2009, Roche et al. 2008). Genetische Defekte vieler anderer Proteine im Muskel können zur Ausbildung von Muskeldystrophien führen (Cohn und Campbell 2000, Emery 2002). Bei einigen konnte bereits nachgewiesen werden, dass es aufgrund unterschiedlicher Pathomechanismen zu einem unkontrollierten Einstrom von Kalzium über die Membran in die Muskelzelle kommt (siehe 1.1.8, Bellinger et al. 2008, Capote et al. 2010, Goonasekera et al. 2011), welches Ursache für den dystrophischen Umbau der Muskulatur sein könnte (siehe 1.1.8, Vandebrouck et al. 2002, Millay et al. 2009, Goonasekera et al. 2011, Edwards et al. 2010). Ob die Dysferlindefizienz ebenfalls zu einem erhöhten Kalziumeinstrom in die Muskelzelle führt und es einen Zusammenhang mit der klinischen Besonderheit der Dysferlinopathien gibt, ist noch nicht belegt und Gegenstand dieser Arbeit.

## **1.1 Grundlagen**

### **1.1.1 Muskelformen**

Die Muskulatur von Menschen und anderer Säuger wird in glatte Muskulatur, Herz- und quergestreifte oder Skelettmuskulatur unterteilt. Glatte Muskulatur, welche für die Kontraktilität der inneren Organe verantwortlich ist, unterliegt der Steuerung des vegetativen Nervensystems und kann nicht willkürlich kontrahiert werden. Herzmuskulatur gehört morphologisch zur quergestreiften Muskulatur, die ihre Bezeichnung aufgrund der quergestreiften Anordnung der Myofibrillen hat (siehe 1.1.2). Herzmuskelzellen sind über Gap-Junctions elektrisch gekoppelt und bilden ein funktionelles Synzytium. Die Kontraktion der Herzmuskulatur unterliegt speziellen Schrittmacherzellen, welche im Sinusknoten lokalisiert sind. Skelettmuskulatur zählt ebenfalls zur quergestreiften Muskulatur und wird

willkürlich über motorische Nervenfasern innerviert. Sie erzeugt schnell für kurze Zeit viel Kraft (vgl. Welsch 2010).

Die Skelettmuskulatur besteht aus vier verschiedenen Typen von Skelettmuskelfasern (Schiaffino und Reggiani 2011), die sich neben der langsamen (Typ I) und der schnellen Isoform (Typ II) der schweren Myosinketten (MHC, engl.: *myosin heavy chain*) in ihrer Kontraktionsgeschwindigkeit, Energiegewinnung, Erscheinung und in ihrem Durchmesser unterscheiden (Spangenburg und Booth 2003, siehe Tabelle 1). Typ I werden langsame, rote Fasern mit einem oxidativen Stoffwechsel zugeordnet. Schnelle Fasern werden in Typ IIA, B und X unterschieden (Schiaffino et al. 1989). Typ IIA erscheint rot und besitzt wie Typ I einen oxidativen Stoffwechsel. Typ IIB erscheint weiß, gewinnt seine Energie durch Glykolyse und hat einen deutlich größeren Durchmesser als Typ I und Typ IIA. Typ IIX ähnelt in seinen Eigenschaften Typ IIA, wurde jedoch aufgrund unterschiedlicher MHC-Isoformen einer eigenständigen Untergruppe zugeordnet.

**Tabelle 1: Muskelfasertypen**

Fasertyp	Kontraktionsgeschwindigkeit	Erscheinung	Metabolismus	Durchmesser
I	Langsam	Rot	Oxidativ	Klein
IIA	Schnell	Rot	Oxidativ	Mittel
IIB	Schnell	Weiß	Glykolyse	Groß
IIX	Schnell	Weiß	Glykolyse	Groß

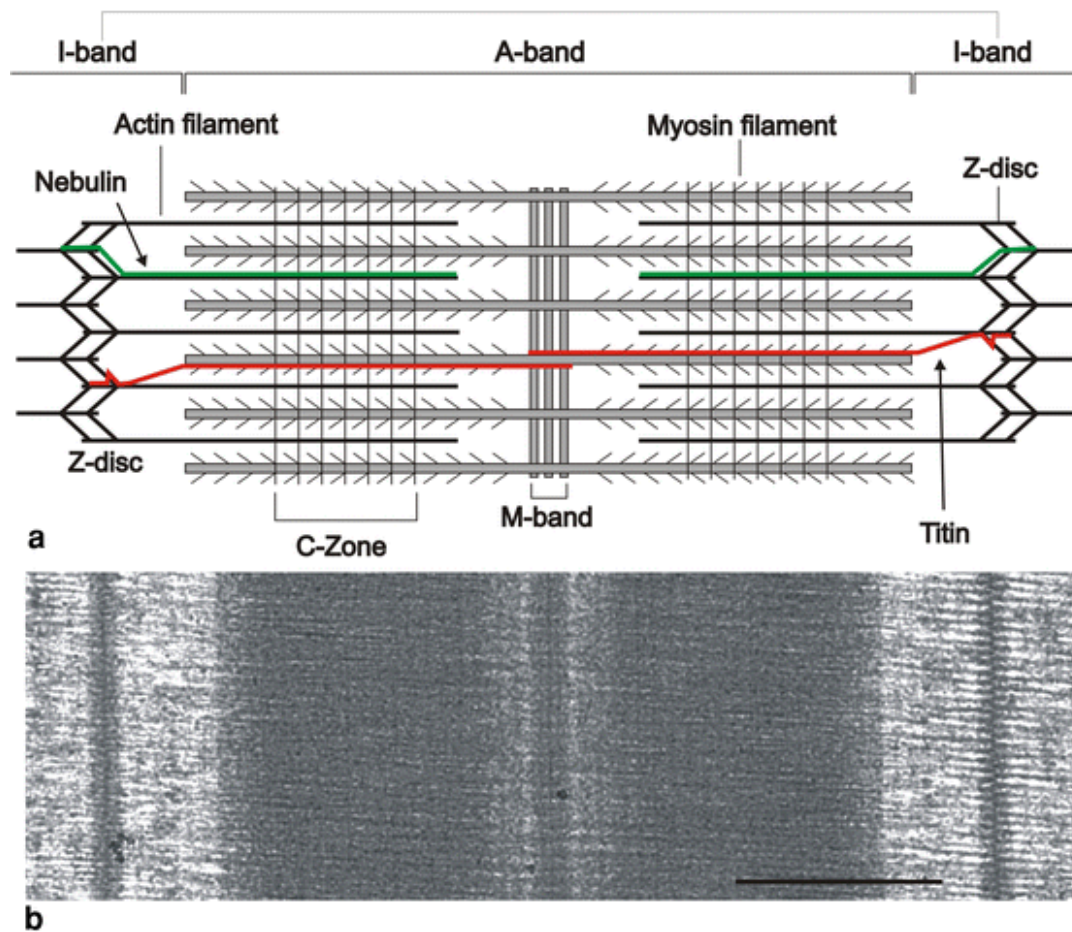
Tabelle nach Schiaffino und Reggiani 2011.

### 1.1.2 Aufbau der Skelettmuskulatur

Der Skelettmuskel besteht aus Skelettmuskelfasern, die einen Durchmesser von 10-100 µm haben und bis zu einigen Zentimetern lang werden können (vgl. Welsch 2010). Eine Skelettmuskelfaser ist aus mehreren Myofibrillen aufgebaut, welche einen Durchmesser von ca. 1 µm haben und in ihrer Länge den Muskelfasern entsprechen. Die Myofibrillen sind vom Zytoplasma, welches im Muskel als Sarkoplasma bezeichnet wird, umgeben. Im Sarkoplasma befinden sich unter anderem Zellkerne, Mitochondrien und das im Muskel als Sauerstoffspeicher dienende Myoglobin. Umhüllt sind die Myofibrillen von einer Zellmembran, dem Sarkolemm und einer Basalmembran. Das Sarkolemm bildet Einstülpungen in das Sarkoplasma, sogenannte transversale Tubuli (T-Tubuli), welche die gesamte Muskelfaser in strikter Anordnung durchziehen und die elektromechanische

Kopplung zwischen Nervenfasern und Muskel ermöglichen. Ein T-Tubulus mit den angrenzenden Membranen des Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) wird als Triade bezeichnet. Der Bereich zwischen der Membran des T-Tubulus und der Membran des SR wird als junctionaler Spalt bezeichnet (siehe 1.1.3).

Die Querstreifung der Skelettmuskulatur ist durch ein regelmäßiges Bandenmuster charakterisiert und entsteht infolge der Anordnung verschiedener Filamente. Die hellen Banden, I-Banden genannt, sind von einer dunkleren Linie, der Z-Linie, durchzogen. Die dunklen Banden, A-Banden genannt, sind von einer helleren Zone, der H-Zone und einem mittigem M-Streifen durchzogen (siehe Abbildung 1, vgl. Welsch 2010).

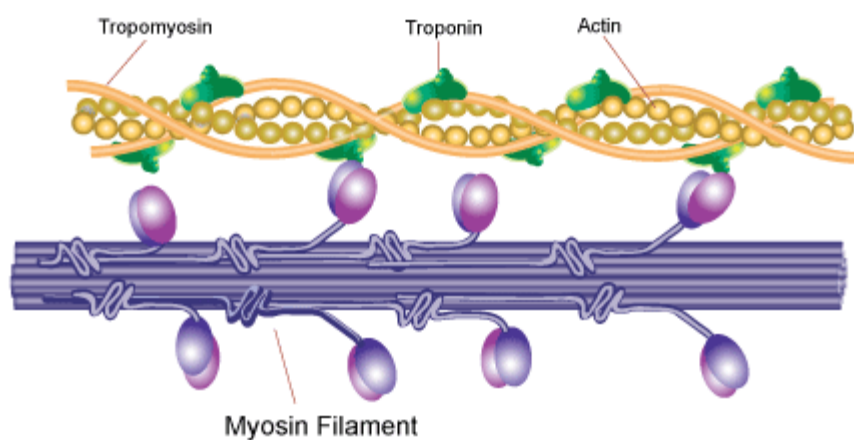


### Abbildung 1: Darstellung quergestreifter Skelettmuskulatur

Abbildung des charakteristischen Musters quergestreifter Muskulatur. Abbildung a) zeigt eine schematische Darstellung der quergestreiften Muskulatur zur Verdeutlichung der in Abbildung b) dargestellten elektronenmikroskopischen Aufnahme. Die dunklen Banden (A-Banden) liegen im Bereich der dicken Myosinfilamente. Durchzogen sind sie von einer hellen H-Zone mit mittlerem M-Streifen. Die hellen Banden (I-Banden) sind von einer dunklen Z-Linie durchzogen (engl.: *Z-disc*). In diesem Bereich sind die Aktinfilamente verankert. Der Aktin-Myosinkomplex ist durch Titin stabilisiert. Zwischen zwei Z-Linien erstreckt sich die funktionelle Einheit einer Myofibrille, das Sarkomer. Maßstabsbalken 500nm. (Luther 2009, CC BY-NC 4.0)

Die funktionelle Einheit einer Myofibrille ist das Sarkomer. Es erstreckt sich zwischen zwei Z-Linien und wird durch Filamente gebildet, die bei der Kontraktion ineinandergreifen. Die dicken Myosinfilamente sind im Bereich der A-Banden lokalisiert. Sie enthalten vier leichte und zwei schwere Polypeptidketten, die wiederum über einen mobilen Halsstil mit dem Kopfteil verbunden sind. Das Kopfteil und der Halsstil ergeben zusammen den Hebelarm und sind die Verbindungsstelle zwischen den Myosin- und Aktinfilamenten. Stabilisiert werden die Myosinfilamente durch Titin, ein elastisches, fibrilläres Molekül. Die dünnen

Aktinfilamente befinden sich im Bereich der I-Banden. Sie reichen von den Z-Linien, an denen sie verankert sind, bis zwischen die Myosinfilamente. Auf ein Myosinfilament kommen 6 Aktinfilamente. Die Aktinfilamente bestehen aus 2 Ketten mit denen Tropomyosin verläuft. Tropomyosin ist mit dem Troponinkomplex, der in drei Untereinheiten geteilt ist, verbunden und fungiert zusammen mit ihm als Regulatoreinheit. Troponin T bindet an Tropomyosin, Troponin C bindet Kalzium und Troponin I hemmt im Ruhezustand die Myosinkopfbindung. Die Aktinfilamente werden durch das fibrilläre Protein Nebulin stabilisiert (vgl. Welsch 2010).



### Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aktin-Myosinkomplexes

Darstellung des Sarkomers, der funktionellen Einheit der Myofibrille und die ihm regelmäßig zugeordneten Filamente Aktin und Myosin. Aktin besteht aus 2 Ketten, die mit dem Tropomyosin verlaufen. Tropomyosin ist mit dem Troponinkomplex (Troponin T, C und I) verbunden. Das Ineinandergreifen der Aktin- und Myosinkomplexe ermöglicht die Kontraktur der Muskulatur. Größe der Proteine nicht maßstabsgetreu. (Abbildung Internetquelle 1, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Sigma-Aldrich, Merck KGaA).

Der Ablauf der Muskelkontraktion verläuft im Querbrückenzyklus. Dieser beschreibt die Muskelkontraktion mit dem Zusammenspiel von Aktin- und Myosinfilamenten und die daraus resultierende Sarkomerverkürzung. Die steigende sarkoplasmatische Kalziumkonzentration ist eine Voraussetzung dafür (Brenner et al. 2005).

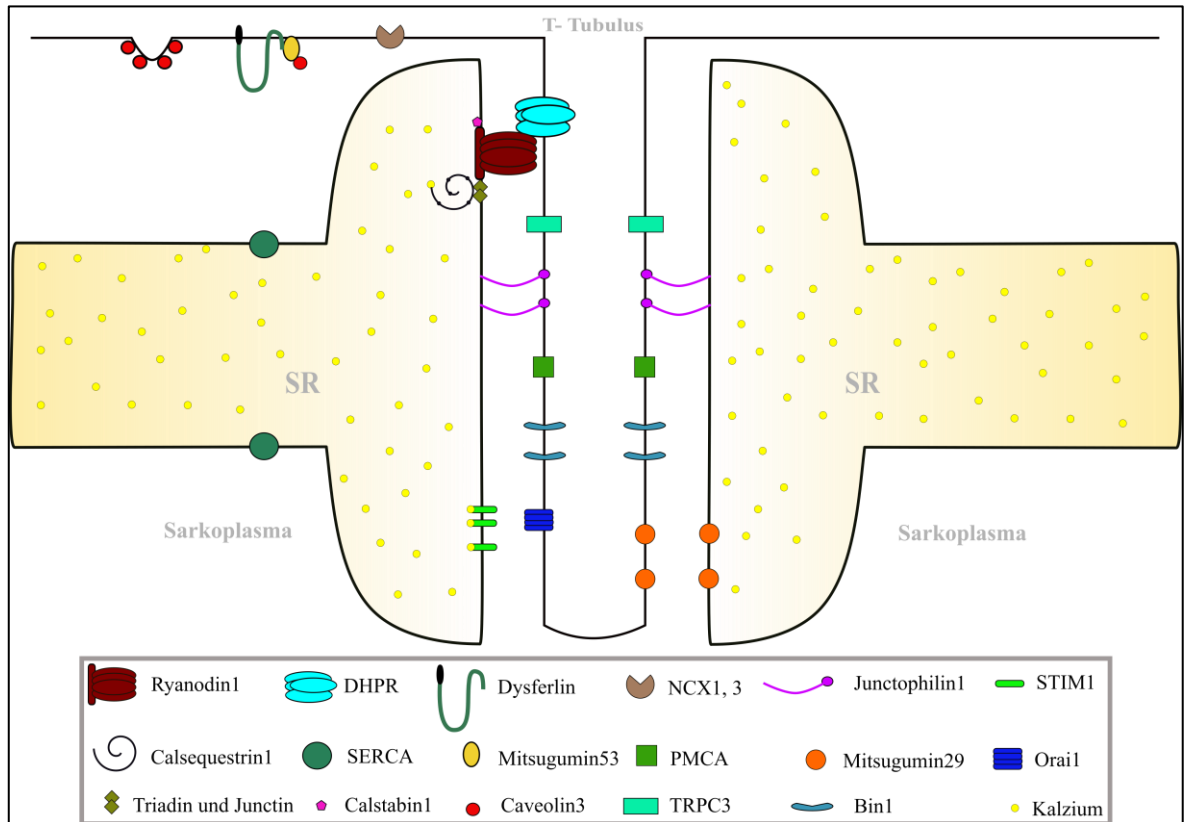
Im relaxierten Muskel ist der Myosinkopf des Myosinfilamentes mit Adenosintriphosphat (ATP) beladen. Die ATP Spaltung in Adenosindiphosphat und Phosphat (ADP und  $P_i$ ) bewirkt eine Anlagerung des Myosinkopfes mit einer Stellungsänderung des Hebelarms an ein Aktinfilament in Richtung Z-Linie. Dort ist es zunächst an der niederaffinen Bindungsstelle an Aktin gebunden. Die hochaffine Bindungsstelle wird durch den Tropomyosin-Troponinkomplex blockiert. Kommt es nun durch ein fortgeleitetes



Aktionspotenzial und der Öffnung des Ryanodin-Rezeptors (RyR) zur Erhöhung der Kalziumkonzentration auf über  $10^{-7}$  mol/l, binden bis zu 4 Kalziumionen an Troponin C. Dies führt zu einer Umlagerung des Komplexes und zur Bindung zwischen Myosinkopf und hochaffiner Bindungsstelle an Aktin. Durch die Abdissoziation von  $P_i$  kommt es zu einem ersten Kraftumschlag, der die Filamente 6-8 nm gegeneinander verschiebt. Ein zweiter Kraftumschlag folgt durch die Abdissoziation von ADP und ermöglicht eine weitere Verschiebung um 2-4 nm. Eine erneute Bindung von ATP an den Myosinkopf löst die hochaffine Bindung auf und der Querbrückenzyklus kann erneut durchlaufen werden (vgl. Welsch 2010).

### **1.1.3 Triadenproteine**

Als Triaden werden im Muskel die Einstülpung des T-Tubulus mit den jeweils angrenzenden Membranen des SR bezeichnet. Diesem Komplex ist eine Vielzahl von Proteinen zugeordnet (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Triadenproteine**

Schematische Abbildung der Triadenproteine. Die Triaden werden durch einen sich einstülpenden T-Tubulus, über den das Aktionspotenzial in die Zelle geleitet wird und zwei ihn umgebende SR gebildet. Der Bereich zwischen den Membranen des SR und des T-Tubulus wird als junctionaler Spalt bezeichnet. Größe der Proteine nicht maßstabsgetreu. (Eigene Zeichnung, modifiziert nach Al-Qusairi und Laporte 2011)

#### 1.1.4 Kalzium im Skelettmuskel

Verantwortlich für den Ablauf und die Steuerung der Muskelkontraktion ist das Einströmen von Kalzium in die Muskelzelle. Um eine Kontraktion zu lösen, muss Kalzium wieder aus dem Sarkoplasma ausgeschleust werden. Dieses gezielte Ein- und Ausschleusen von Kalzium wird als Kalziumhomöostase bezeichnet und beruht auf einer Vielzahl streng regulierter Mechanismen.

##### 1.1.4.1 ECC und CICR

Der Impuls einer Bewegung entsteht über die Fortleitung von Aktionspotenzialen über motorische Nervenbahnen, die zum Kalziumeinstrom in Skelettmuskelzellen führen. Diesen Vorgang nennt man elektromechanische Kopplung oder auch Erregungs- Kontraktions-

Kopplung (engl.: *excitation contraction coupling, ECC*, Parness et al. 2009). Es ist ein streng regulierter und komplizierter Prozess, der molekular noch nicht in allen Einzelheiten verstanden ist. Aktionspotenziale werden über alpha-Motoneurone zu den Skelettmuskelzellen geleitet. Dort bewirken sie eine Öffnung der im Sarkolemm liegenden spannungsabhängigen Natriumkanäle. Deren Öffnung führt durch Einstrom von Natrium zur Depolarisation der Zellmembran und zur Fortleitung des Signals über T-Tubuli, bis tief in die Muskelzellen hinein. Angelagert an T-Tubuli, die zwischen der A- und der I-Bande verlaufen (siehe 1.1.2), liegen terminale Zisternen des SR. Das SR, auch longitudinales tubuläres System genannt, ist der Kalziumspeicher der Muskelzelle und steht über verschiedene Proteine und Rezeptoren mit dem T-Tubulussystem funktional und morphologisch in Verbindung (siehe 1.1.3, Abbildung 3). Die Fortleitung des Aktionspotenzials über T-Tubuli führt zur Konformationsänderung des spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanals, dem Dihydropyridin-Rezeptor (DHPR), der in Verbindung mit dem RyR steht. Der RyR ist im SR lokalisiert. Durch die Konformationsänderung des DHPR wird der RyR geöffnet und Kalzium strömt aus dem SR ins Sarkoplasma. Im Skelettmuskel ist der Vorgang des ECC hauptverantwortlich für die Kalziumfreisetzung und Konzentrationserhöhung im Sarkoplasma (Calderón et al. 2014). Ein weiterer Mechanismus, der zum Ausstrom von Kalzium aus dem SR führt, ist die Kalzium induzierte Kalzium Freisetzung (engl.: *calcium-induced calcium release, CICR*). Dieser Erregungsmechanismus ist hauptsächlich verantwortlich für die Kalziumfreisetzung aus dem SR in Herzmuskelzellen, wurde jedoch zuerst im Skelettmuskel entdeckt (Endo et al. 1970). Hierbei kommt es nicht durch eine Konformationsänderung, sondern durch den Anstieg der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration zu Öffnung des RyR und Freisetzung von Kalzium aus dem SR (Endo 2009).

#### 1.1.4.2 Ryanodin/- DHPR Komplex

Der RyR, mit einer Masse von 565 kDa (Takeshima et al. 1989), liegt in der Membran des SR und fungiert dort als Kalziumkanal. Bisher bekannt sind 3 Isoformen (RyR 1, 2, 3). RyR1 ist skelettmuskelspezifisch und RyR2 ist herzmuskelspezifisch. RyR3 kommt in niedriger Konzentration auch in der Skelettmuskulatur vor, seine genaue Funktion ist jedoch noch unbekannt (Fill und Copello 2002). Im Skelettmuskel steht RyR1 mit mehreren Proteinen in Verbindung. Die Bedeutendste ist die funktionelle Kopplung zwischen RyR1 und dem DHPR. Der DHPR liegt als membranständiges Protein im Bereich der Triaden entlang der

T-Tubuli, gehört zur Familie der spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanäle und besteht aus mehreren Untereinheiten:  $\alpha_{1s}$  (auch  $\text{Ca}_v$  1.1),  $\alpha_2$ ,  $\beta_{1A}$ ,  $\delta_1$  und  $\gamma$ . Zusammen ergeben sie eine Masse von 437 kDa (Szpyt et al. 2012). Im Skelettmuskel schließen sich diese DHPR-Komplexe zu Tetrameren zusammen, mit denen jeweils ein RyR in Verbindung steht (Protasi 2002). RyR1 besteht aus zwei Domänen. Ein hydrophober Anteil liegt in der Membran des SR und formt den Kalziumkanal. Ein hydrophiler Anteil besteht aus vier Untereinheiten und erstreckt sich über den junktionalen Spalt, der sich zwischen den Membranen des SR und des T-Tubulus befindet. Der hydrophile Anteil macht den Großteil des Proteins aus (Block et al. 1988) und steht in Verbindung mit dem DHPR. Kommt es durch Fortleitung eines Aktionspotentials zur Konformationsänderung im DHPR, führt dieses zur Öffnung des RyR1 und infolgedessen zum Kalziumausstrom aus dem SR ins Sarkoplasma (Protasi 2002, s. auch Kapitel 1.1.4.1).

RyR1 ist mit weiteren Proteinen im SR gekoppelt. Calsequestrin (CSQ), mit einer Masse von 44 kDa, wurde von MacLennan und Wong 1971 als Kalzium bindendes Protein im SR lokalisiert, wo es sich in den terminalen Zisternen befindet (Franzini-Armstrong et al. 1987). Bisher sind zwei Isoformen bekannt. CSQ1 (auch: sCSQ) kommt in Typ I und Typ II Skelettmuskelfasern vor und CSQ2 (auch: cCSQ) findet sich in Herzmuskelzellen. CSQ1 ist Teil eines Komplexes mit Triadin und Junctin. Diese Proteine liegen in der Membran des SRs und sind jeweils mit Abschnitten von RyR1 und CSQ1 verbunden (Novák und Soukup 2011). Versuche von Györke et al. 2004 führten zu der Annahme, dass CSQ1 als intraluminaler Kalziumsensor agiert und Triadin und Junctin zwischen RyR1 und CSQ1 vermitteln. Auch Calstabin1 (FKBP12), ein 12 kDa großes Protein, steht mit RyR1 in funktioneller Verbindung. Es fördert das geschlossene Stadium von RyR1 (Wehrens et al. 2004).

#### 1.1.4.3 Mitsugumin29 (MG29 oder SYPL2)

Mitsugumin29 wurde von Takeshima et al. 1998 als ein weiteres Triadenprotein beschrieben und aufgrund der Ähnlichkeiten der cDNA der Familie der Synaptophysine zugeordnet. An den Triaden lokalisiert das 29 kDa große Protein an die Membran der terminalen Zisterne des SR und des T-Tubulussystems (Brandt und Caswell 1999). Die Lokalisation ist abhängig vom Stadium der Muskelentwicklung. Bei Muskelzellen von Kaninchen ist MG29 bereits am 15. Embryonaltag in der Membran des SR zu finden und am 27. auch an der des T-

Tubulussystems. In adulten Muskelzellen ist MG29 hingegen strikt auf den Bereich der Triaden beschränkt (Komazaki et al. 1999).

Die Beteiligung von MG29 an der Entstehung und Reifung des glatten SR bestätigten Versuche, bei welchen die cRNA von MG29 in embryonale Zellen von Amphibien eingeschleust wurde. Die Einschleusung der cRNA von MG29 führt zur Ausbildung eines glatten SRs (Komazaki et al. 1999). Eine weitere Bestätigung lieferten Versuche mit murinen MG29-knockout-Muskelzellen. Ist MG29 ausgeschaltet, führt dies zu einer abnormalen Membranstruktur der Muskelzelle, sowie zu geschwollenen T-Tubuli und zur Bildung von Vakuolen im SR (Komazaki et al. 2001). Ein Einfluss auf die elektromechanische Kopplung im Skelettmuskel lässt sich durch eine funktionelle Interaktion von MG29 und dem RyR nachweisen. Eine Überexpression von MG29 in Ovarienzellen des Hamsters führt zu einer Aktivitätssteigerung von RyR (Pan et al. 2004). Weiter führt eine Co-Expression von MG29 und RyR zur intrazellulären Erhöhung der Kalziumkonzentration durch Entleerung des SR und daraufhin zum Zelltod (Pan et al. 2004).

#### 1.1.4.4 Bin1 (Amphiphysin2)

Bin1 gehört zur Amphiphysin/RVS Protein Familie, welche eine wichtige Rolle bei den Vorgängen der Endozytose spielen. Es dient als Bindeapparat zwischen Dynamin und Clathrin bei Clathrin-vermittelter Endozytose (Takei et al. 1999). Im Muskel wird die 60 kDa große Amphiphysin-Isoform Amphiphysin2 (Bin1) exprimiert. Dort lokalisiert es innerhalb der I-Bande entlang der Z-Linie und konzentriert sich um die T-Tubuli (Butler 1997). Zum einen ist Bin1 für die Instandhaltung des tubulären Systems mitverantwortlich. So zeigt sich in Bin1-knockout-Muskelzellen ein ungeordnetes, reduziertes T-Tubulussystem (Razzaq et al. 2001). Zum anderen bindet Bin1 Lipidmembranen und führt bei heterologer Expression in nicht-Muskelzellen zur Ausbildung tubulärer Strukturen (Lee et al. 2002).

Dieser Einfluss auf das T-Tubulussystem legt einen Einfluss auf die Kalziumhomöostase nahe, der sich nach elektrischer Erregung (siehe 1.1.4.1) von murinen Bin1-knockout-Muskelzellen zeigt. Diese weisen eine verminderte Amplitude des Kalziumeinstroms in die Zelle sowie einen verminderten Kalziumtransienten im SR auf. Die Ergebnisse bestätigen einen Einfluss auf die elektromechanische Kopplung und demzufolge auf die Kalziumhomöostase (Tjondrokoesoemo et al. 2011). Dass Bin1 zudem essenziell für die Muskeldifferenzierung ist, zeigt sich in Versuchen, bei denen Bin1 blockiert wurde und es

zur gestörten Muskelentwicklung mit fehlender Myoblastenverschmelzung und Differenzierung kommt (Lee et al. 2002). Bestätigen konnten dies Wechsler-Reya et al. 1998, die in C2C12 Zellen Bin1 antisense-RNA injizierten. Auch dies führt zu einer verminderten Zelldifferenzierung. Zudem führen Mutationen im Bin1-Gen zu Formen der autosomal-rezessiven zentronukleären Myopathie (Nicot et al. 2007).

#### 1.1.4.5 Caveolin3

Als Caveolae werden kleine Einbuchtungen in Membranen genannt, zu deren Struktur die Proteine der Caveolin-Familie beitragen. Sie bestehen vor allem aus Sphingolipiden und Cholesterol und werden nach aktuellem Forschungsstand in drei verschiedene Caveoline (Caveolin1, -2, -3) unterschieden (Smart et al. 1999). Caveolin3 ist die muskelspezifische Form mit einer Größe von 18-20 kDa, welche insbesondere im Herzmuskel und in der Skelettmuskulatur, aber auch zum Teil in der glatten Muskulatur, exprimiert wird. In adulten Muskelzellen kolokalisiert es mit Dystrophin, welches die Verbindung zwischen Aktinfilamenten und der im Sarkolemm liegenden Sarkoglykankomplexe herstellt. Während der Myoblastendifferenzierung ist Caveolin3 hochreguliert und lokalisiert zunächst an die sich entwickelnden T-Tubuli, bevor es im Bereich des Sarkolemm zu finden ist (Song et al. 1996, Parton et al. 1997).

Defekte im Caveolin3-Gen können zu einer Vielzahl an muskulären Erkrankungen führen. Bekannte Folgen sind bisher die Gliedergürtelmuskeldystrophie vom Typ 1C (engl.: *limb girdle muscular dystrophy 1C*, *LGMD1C*, Minetti et al. 1998), eine distale Myopathie, eine hypertrophe Kardiomyopathie und eine isolierte Erhöhung der Kreatinkinase (CK) im Serum ohne Muskelschwäche oder Zeichen einer Myopathie (Gazzerro et al. 2010). Zudem kann bei Patienten mit Caveolinopathien ein *rippling muscle disease* (RMD) vorliegen (Betz et al. 2001, Dotti et al. 2006). Typischerweise kommt es hier nach rascher Dehnung der Muskulatur zu einer sich wellenartig ausbreitenden Muskelkontraktion (engl.: *rippling*=Kräuselung). Es zeigt sich klinisch eine Übererregbarkeit der Muskulatur, bei der nach mechanischem Druck auf den Muskel rasche, nicht habituierende Muskelkontraktionen folgen. Charakteristischerweise ist die Kreatinkinase im Serum erhöht. Selten kommt es zu Paresen oder Muskelatrophien. Die Pathogenese der Erkrankungen ist noch nicht komplett verstanden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Skelettmuskulatur mit Caveolin-Defizienz zeigen eine fehlerhafte Ausbildung des T-Tubulussystems (Gazzerro et al. 2010). Zudem wurden die Kolokalisation sowie ein Einfluss auf die Leitfähigkeit des DHPR

nachgewiesen. In Caveolin3-defizienten murinen Muskelzellen ist die Leitfähigkeit des DHPR um die Hälfte reduziert und somit die Kalziumhomöostase signifikant alteriert (Couchoux et al. 2007).

#### 1.1.4.6 Mitsugumin53 (MG53, TRIM72)

Die Familie der TRIM-Proteine (engl.: *tripartite motif protein family*) wurden von Reddy et al. 1991 als neue Gruppe von Phosphoproteinen entdeckt. Sie sind an vielerlei zellulären Vorgängen sowie der antiviralen Abwehr beteiligt (Nisole et al. 2005). Zudem spielen sie eine wichtige Rolle in membranabhängigen Prozessen wie der Exozytose. Wichtig hierfür ist das muskelspezifische Mitsugumin53 (MG53), welches ohne Transmembrandomäne, vereinigt mit subsarkolemmal gelegenen Vesikeln, in der Muskelzelle zu finden ist und eine Größe von 53 kDa hat (Cai et al. 2009b). Fehlt MG53, kommt es zu einer progressiven Myopathie mit eingeschränkter Belastungsfähigkeit. (Cai et al. 2009a). Mikroskopisch sind fehlerhafte sarkolemmale Membranreparaturen nachzuweisen (Cai et al. 2009a). Fehlerhafte Membranreparaturen sind ebenfalls bei Fehlen von Dysferlin (Chiu et al. 2009, Roche et al. 2008) und Caveolin3 (Cai et al. 2009c) zu sehen. Zudem kommt es bei Mutationen im Caveolin3 Gen zu einer veränderten intrazellulären Lokalisation von Dysferlin und MG53 (Cai et al. 2009c). Darüber hinaus ist MG53 notwendig für die zielgerichtete Ansammlung von Dysferlin um die defekte Membranstelle. (Cai et al. 2009c). Diese Ergebnisse könnten auf ein Zusammenspiel zwischen MG53, Caveolin3 und Dysferlin hinsichtlich der Vorgänge der Membranreparatur hindeuten.

#### 1.1.4.7 Junctophilin (JP)

Die Gruppe der Junctophiline wurde zuerst von Takeshima et al. 2000 beschrieben. Es gibt vier Subtypen von Junctophilin. JP-1 und JP-2 werden im Skelettmuskel exprimiert. JP-2 ist die einzige Untereinheit, die zudem im Herzmuskel und in der glatten Muskulatur vorkommt. JP-3 und JP-4 sind Neuronen-spezifisch (Nishi et al. 2003).

Im Skelettmuskel ist JP-1 für die Membranstabilität und die regelgerechte Spaltbildung zwischen den Membranen der Triaden verantwortlich. Es spannt sich zwischen der Membran der T-Tubuli und der des SRs und ist in beiden Membranen verankert (Nishi et al. 2000). Bei murinen JP-1-knockout-Muskelfasern zeigen sich eine veränderte Triadenmorphologie sowie eine fehlerhafte postnatalen Entwicklung der Triadenausbildung.

Im Bereich der terminalen Zisternen im SR bilden sich Vakuolen. Die JP-1-knockout-Mäuse versterben innerhalb ihres ersten Lebensstages (Komazaki et al. 2002, Ito et al. 2001). Des Weiteren wurde eine Interaktion zwischen JP-1 und RyR1 (Phimister et al. 2007), sowie JP-1 und JP-2 und dem DHPR nachgewiesen (Golini et al. 2011).

#### 1.1.4.8 TRPC3 (transient receptor potential channel)

Die TRPC Proteine sind eine Untergruppe der TRP-Superfamilie, die eine Klasse von Kationkanälen bilden (Montell 2005). Es gibt sieben TRPC-Isoformen, von denen sechs im Mensch vorkommen. Es werden verschiedene Theorien über ihre Aktivierung diskutiert. Neben rezeptorvermittelter oder sensorischer Aktivierung wurde den TRPC-Kanälen eine Aufgabe im SOCE Mechanismus zugeschrieben (siehe 1.1.8; Clapham 2003). In Versuchen mit Mäusen zeigt sich, dass im Skelettmuskel die Isoformen 1, 2, 3, 4, und 6 exprimiert werden. Auf immunhistochemisch angefertigten Bildern lokalisieren TRPC 1,4 und 6 entlang der Zellmembran, TRPC3 jedoch weiter in der Zelle von der Membran entfernt. Dieses lässt vermuten, dass TRPC3 entlang des T-Tubulussystems als Kationenkanal fungiert (Vandebrouck et al. 2002). Es gibt Hinweise dafür, dass die TRPC-Kanäle eine wichtige Rolle in der Muskeldifferenzierung spielen, da TRPC1 und TRPC3 während der Myoblastenphase hochreguliert sind (Gailly 2012). Zudem wurde ein Einfluss von TRPC3 auf die Kalziumhomöostase nachgewiesen. In murinen TRPC Knockout-Muskelzellen kommt es zu einer signifikant reduzierten Kalziumamplitude nach induzierter Aktivierung des RyR1 (Lee et al. 2006).

#### 1.1.5 Speichergesteuerte Kalziumströme (SOCE)

Das regulierte Ein- und Ausströmen von Kalzium in der Muskelzelle ist Voraussetzung für die Muskelkontraktion und -entspannung. Diese Kalziumhomöostase wird von einer Vielzahl von Proteinen reguliert. Neben dem Mechanismus der elektromechanischen Kopplung (siehe 1.1.4.1) kann der fehlerhafte Ablauf des speichergesteuerten, transsarkolemmalen Kalziumstroms (engl.: *store operated calcium release, SOCE*) zu einer Störung der Kalziumhomöostase führen.

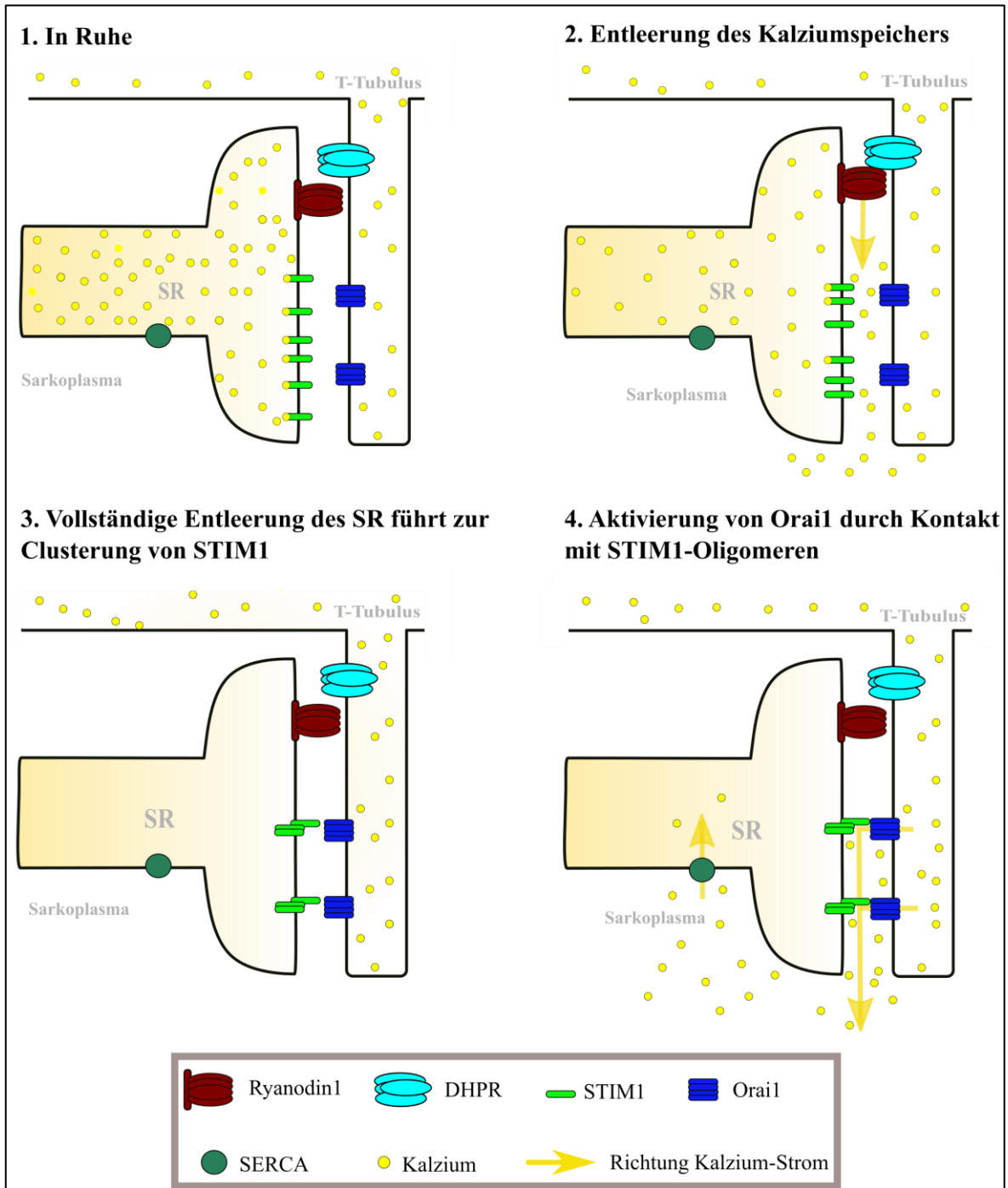
Der Mechanismus des SOCE in der Muskelzelle wurde zuerst von Kurebayashi und Ogawa 2001 beschrieben. Die an diesem Mechanismus beteiligten Proteine sind STIM1 (engl.: *stromal interaction molecule 1*) und Orai1 (auch: CRACM1) (Liou et al. 2005, Vig et al.



2006). In Ruhe ist STIM1 gleichmäßig als Monomer in der Membran des SRs verankert und hat auf der transsaroplasmatischen Seite Kalzium gebunden. Orai1-Moleküle formen einen in der T-Tubulusmembran verankerten inaktiven Kanal. Die Voraussetzung für SOCE ist eine vollständige Entleerung des Kalziumspeichers des SRs, welche durch dauerhafte Stimulation der Muskelzellen in kalziumfreier Lösung, Hemmung des Rücktransportes ins SR oder Agonisierung des RyR erreicht werden kann.

Die Entleerung des SRs führt dazu, dass STIM1-Proteine aggregieren und sich als Oligomere gegenüber den Orai1-Kanälen finden. Ein Kontakt dieser beiden Moleküle führt zur Aktivierung des Orai1-Kanals, der einen Kalziumkanal bildet und über den es zum Einstrom von Kalzium in die Muskelzelle kommt. Die Aktivierung von Orai1 ist dabei direkt abhängig von STIM1 (Park et al. 2009). Die CAD-Domänen in STIM1 binden das N- und C- Terminale Ende von Orai1, öffnen den Kanal und ermöglichen den Kalziueinstrom.

Das sich anreichernde Kalzium im Zytoplasma wird über die im SR liegenden Kalzium-ATPasen zurück ins SR gepumpt und schließlich die intrazellulären Kalziumspeicher wieder aufgefüllt (Launikonis et al. 2010). Die Wiederaufnahme von Kalzium in das SR beendet SOCE. Kalzium bindet wieder an STIM1-Moleküle und löst deren Aggregation auf. Der Kontaktverlust zwischen STIM1 und Orai1 stoppt den Kalziueinstrom in die Muskelzelle. Siehe hierzu Abbildung 4.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der speichergesteuerten Kalziumströme (SOCE)**

Abbildung der speichergesteuerten Kalziumströme. 1. In Ruhe ist Kalzium im SR der Muskelzelle gespeichert. Der RyR ist geschlossen. STIM1 Moleküle liegen als Kalzium gebundene Monomere in der Membran des SR. Orai1 ist als inaktiver Kalziumkanal in der T-Tubulusmembran vorhanden. 2. Durch Öffnung des RyR kommt es zur Entleerung des SR. Kalzium löst sich von STIM1. 3. Die vollständige Entleerung des SRs führt zur Oligomerisierung von STIM1. Orai1 und STIM1 Oligomere finden sich an den Membranen gegenüber und Orai1 wird aktiviert. 4. Kalzium gelangt durch Orai1 ins Sarkoplasma und wird zur Auffüllung des Speichers in das SR gepumpt. Größe der Proteine nicht maßstabsgetreu. (Eigene Zeichnung, modifiziert nach Launikonis et al. 2010, Dirksen 2009)

#### 1.1.5.1 Mitsugumin29 (MG29)

Mitsugumin29 ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase. Das Fehlen von Mitsugumin29 führt zu einer Veränderung der elektromechanischen Kopplung in Mitsugumin29-knockout-Zellen (Kapitel 1.1.4.1). Zudem haben Mitsugumin29-knockout-Zellen einen veränderten SOCE-Mechanismus. Werden die Kalziumspeicher vollständig entleert und der SOCE-Mechanismus aktiviert, kommt es in Mitsugumin29-knockout-Zellen zu einem verminderten Kalziumeinstrom im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Pan et al. 2002).

### 1.1.6 Hinausschleusen von Kalzium aus dem Sarkoplasma

Einen weiteren Einfluss auf die Kalziumhomöostase haben Kanäle und ATPasen, welche im Austausch oder unter Energieverbrauch Kalzium aus der Zelle schleusen, um die intrazelluläre Konzentration gering zu halten.

#### 1.1.6.1 SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase)

Als SERCA wird die in der Membran des Sarco-/ Endoplasmatischen Retikulums liegende Kalzium-ATPase bezeichnet. Ihre Funktion beruht auf dem aktiven Rücktransport von Kalzium aus dem Sarkoplasma in den Kalziumspeicher, das SR. Bisher wurden 3 verschiedene SERCA-Gene (SERCA1, SERCA2 und SERCA3) identifiziert, die durch alternatives Spleißen in eine Mehrzahl an Untergruppen unterschieden werden. SERCA1, mit einer Größe von ungefähr 110 kDa, befindet sich hauptsächlich in Skelettmuskelfasern vom Typ II mit schneller Kontraktionsgeschwindigkeit. SERCA2 wird in SERCA2a, welche maßgeblich im Herzmuskel, glatter Muskulatur und Skelettmuskulatur vom Typ I exprimiert wird und SERCA2b, welche ebenfalls vorwiegend im Herzmuskel, Skelettmuskel und in nicht-Muskelzellen vorkommt, unterteilt (Chemaly et al. 2013).

#### 1.1.6.2 PMCA (plasma membrane calcium-ATPase)

PMCA sind ATPasen, die in der junctionalen Plasmamembran liegen und unter Verbrauch von ATP Kalzium aus dem Zytoplasma schleusen, um dessen Konzentration in der Zelle niedrig zu halten (Cully et al. 2012).

### 1.1.6.3 NCX (Natrium/ Kalziuaustauschkanäle)

Zu dieser Gruppe gehören Natrium/ Kalziuaustauschkanäle, die in Zellmembranen verankert und für den Ausstrom von Kalzium mitverantwortliche sind. Sie werden in drei Gruppen unterteilt. NCX1 wird ubiquitär sowie vermehrt in Herz-, Gehirn- und Nierengewebe exprimiert. NCX3 kommt in der Skelettmuskulatur und neben NCX2 auch im Gehirn vor (Lytton 2007).

### 1.1.7 Muskeldystrophien

Muskeldystrophien sind eine Gruppe genetisch determinierter Erkrankungen, die zu einem fortschreitenden Untergang von Muskelmasse und damit zu einer Muskelschwäche führen (Cohn und Campbell 2000). Häufig werden sie bereits im Kindes- und Jugendalter symptomatisch. Ursächlich ist der Verlust oder eine fehlerhafte Produktion bestimmter Muskelproteine aufgrund von Genmutationen. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die für diese Arbeit relevanten Muskeldystrophien.

**Tabelle 2: Übersicht Muskeldystrophien**

Gen/ Protein	Vererbung	Erkrankung	Mausmodell
Dystrophin	XR	Duchenne/ Becker Muskeldystrophie	Mdx
Dysferlin	AR	Miyoshi-Myopathie	Dysf <sup>tm1Lcam</sup>
	AR	Gliedergürtelmuskeldystrophie (LGMD2B)	
Caveolin3	AD	Gliedergürtelmuskeldystrophie (LGMD1C)	
Calpain3	AR	Gliedergürtelmuskeldystrophie (LGMD2A)	
Sarcoglycan ( $\gamma, \alpha, \beta, \delta$ )	AR	Gliedergürtelmuskeldystrophie (LGMD2C-F)	Scgd <sup>-/-</sup>

Die Tabelle zeigt eine Übersicht der für diese Arbeit relevanten Muskeldystrophien und deren Proteine, die bei Mutation zur Ausprägung der Dystrophie führen. Für einige Muskeldystrophien gibt es zudem ein entsprechendes Mausmodell. Die Vererbungsformen sind X-chromosomal-rezessiv (XR), autosomal-rezessiv (AR) und autosomal-dominant (AD). Tabelle nach Cohn und Campbell 2000.

### 1.1.8 Die Rolle der Kalziumhomöostase

Das fein abgestimmte Ein- und Ausströmen von Kalzium ins Sarkoplasma ist die Voraussetzung für den Ablauf einer gleichmäßigen Muskelkontraktion (siehe 1.1.4.1, 1.1.5) und bietet einen Ansatzpunkt zur Ursachenforschung für die Entstehung von

Muskeldystrophien. Viele Untersuchungen zu Muskeldystrophien haben gezeigt, dass eine unkontrollierte, erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration zu einem dystrophen Umbau der Muskulatur führt. Diese werden im Folgenden erläutert.

Ein wichtiges Protein für die Kalziumfreisetzung der Zelle ist der im SR gelegene RyR1. Sein geschlossener Zustand wird durch ein weiteres Protein, Calstabin1, unterstützt (Wehrens et al. 2004). Fehlt Calstabin1, kommt es durch die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit von RyR1 in murinen Skelettmuskelzellen zur Entstehung sogenannter *leaky channels* (engl.: durchlässige, undichte Kanäle). Die Folge ist ein gestörter Kalziumausstrom aus dem SR ins Sarkoplasma und dauerhafte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dies führt neben der Veränderung des Membranpotenzials und der Erregbarkeit der Zelle zu einer Muskelfaserschädigung und einer verminderten muskulären Belastbarkeit. Symptome, welche kennzeichnend für Muskeldystrophien sind (Bellinger et al. 2008). Ein dystropher Umbau kann ebenfalls durch eine Überexprimierung von MG29 hervorgerufen werden. Die vermehrte Expression dieses Proteins führt zu einer erhöhten Erregbarkeit des RyR und somit zu einem erhöhten Kalziumeinstrom in die Zelle. Die Folge ist Apoptose (Pan et al. 2004).

Das am besten untersuchte Mausmodell für Muskeldystrophien ist das Modell der Mdx-Maus (engl.: *murine X chromosome-linked muscular dystrophy*). Wiederholt konnten bei diesem Mausmodell verschiedene Ursachen einer veränderten Kalziumhomöostase nachgewiesen werden. Mehrere Studien zeigen, dass die elektromechanische Kopplung zu einem signifikant verminderten Kalziumeinstrom in die Muskelzelle der Mdx-Maus führt (Hollingworth et al. 2008, Capote et al. 2010). Ebenfalls ist der SOCE-Mechanismus in Muskelzellen von Mdx-Mäusen verändert. Der Schwellenwert für die Kalziumkonzentration im SR zur Auslösung des SOCE-Mechanismus ist erhöht (Edwards et al. 2010). Es kommt dementsprechend schneller zur Aktivierung von SOCE und Kalziumeinstrom in die murine Muskelzelle. Ergänzend dazu sind die beiden Proteine des SOCE-Mechanismus (STIM1 und Orai1) im Skelettmuskel von Mdx-Mäusen hochreguliert (Edwards et al. 2010). Weitere Proteine, deren Aktivierung im Zusammenhang mit dem SOCE Mechanismus diskutiert werden, sind die TRPC-Proteine (Clapham 2003). Neben Orai1 und STIM1 ist auch TRPC in Mdx-Muskelzellen vermehrt exprimiert. Blockierung der TRPC-Kanäle führt zu einer Reduzierung um neun Zehntel des Kalziumeinstroms des SOCE-Mechanismus (Vandebrouck et al. 2002). Werden die TRPC-Kanäle in murinen Skelettmuskelzellen überexprimiert, kommt es zu einem erhöhten Kalziumeinstrom in die Muskelzelle und zum

dystrophen Umbau (Millay et al. 2009). Ein weiteres Protein, SERCA, ist für die Wiederaufnahme von Kalzium ins Sarkoplasma verantwortlich und in Mdx-Muskelzellen funktionell verändert (Kargacin und Kargacin 1996). Umgekehrt führt eine Überexpression von SERCA, die eine Erniedrigung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration zur Folge hat, zur Linderung des dystrophen Umbaus der Muskulatur von Mdx- und *Sgcd*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Goonasekera et al. 2011). Letztere sind das entsprechende Mausmodell für die Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ LGMD2C-F (siehe Tabelle 2). Nachgewiesen werden konnte zudem ein Mechanismus zur Gegenregulation der erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration in Mdx-Muskelzellen. Die Kalzium-ATPase PMCA ist hier im Vergleich zu Wildtyp-Muskelzellen hochreguliert und führt folglich zum vermehrten Hinausschleusen von Kalzium aus der murinen Muskelzelle (Cully et al. 2012).

### 1.1.9 Dysferlin

1994 konnte von Bashir et al. ein Gen auf Chromosom 2p13 als Ursache für eine autosomal rezessiv vererbte Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2B (LGMD2B, siehe 1.1.7) identifiziert werden. Aufgrund der Ähnlichkeit zum Protein Fer-1 aus der Familie der Ferline (Bashir et al. 1998) entstand der Name Fer-1-like 1 Protein (FER1L1) oder Dysferlin (Dys=Dystrophie). Dysferlin ist ein Transmembranprotein mit einer molekularen Masse von 237 kDa, bestehend aus einer C-terminalen Transmembrandomäne, sieben C2-Domänen (C2A- C2G) und zwei charakteristischen DysF-Domänen (Britton et al. 2000, Ponting et al 2001).

In Säugetieren konnten bis jetzt sechs FER1L Proteine nachgewiesen werden. Mutationen in Otoferlin, welches hauptsächlich im Vestibularorgan und der Cochlea exprimiert wird (FER1L2), führen zu einer Form eines autosomal rezessiv vererbten Hörverlustes. Myoferlin (FER1L3) ist unter anderem notwendig für Myoblastenregeneration und -fusion. FER1L4-6 konnten bislang, abgesehen von der Genlokalisierung, weder phänotypische Merkmale im Falle einer Mutation noch physiologische Funktionen zugeordnet werden (Lek et al. 2012). Gemeinsames strukturelles Merkmal der FER1L Proteine sind ihre C2-Domänen. Diese sind Abschnitte verschiedener Proteine mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften, welche an membrangebundenen Prozessen beteiligt sind (Nalefski und Falke 1996).

Die klinischen Erscheinungsbilder der dysferlindefizienten Muskeldystrophie sind heterogen und bilden eine Gruppe progressiver Muskelerkrankungen mit Schwäche, Atrophie und einer inflammatorischen Komponente. Neben der LGMD2B (engl.: *limb-*

*girdle muscular dystrophy 2B, LGMD2B*), bei der die Muskelschwäche maßgeblich in den proximalen Muskelgruppen der unteren oder oberen Extremität auftritt, können Mutationen im Dysferlin-Gen zur Miyoshi-Myopathie mit hauptsächlichem Befall der distalen posterioren Kompartimente der Beine führen (Liu et al. 1998). Weiter beschreiben Illa et al. 2001 eine bis dahin unbekannte Muskelerkrankung. Bei dieser führt die Dysferlindefizienz zur Schwäche der distal-anterioren Muskelgruppen. In einer Studie mit 40 Patienten konnten zudem ein proximodistaler Typ mit gleichzeitigem Auftreten von Symptomen in den proximalen und distalen Muskelgruppen der unteren und oberen Extremität, eine pseudometabolische Myopathie mit Schwellung und Schmerzen ohne Muskelschwäche und eine asymptomatische CK-Erhöhung als klinische Manifestation der Dysferlinopathien beschrieben werden (Nguyen et al. 2007). Die phänotypischen Ausprägungen gehen häufig ineinander über und sind klinisch nicht immer eindeutig voneinander abzugrenzen. Neben einer weiten Altersspanne der Erstmanifestation der Symptome mit einer Häufung im späten Jugend- und frühen Erwachsenenalter, ist eine klinische Gemeinsamkeit der Dysferlinopathien, die in deutlichem Gegensatz zu anderen Muskeldystrophien steht, die meist überdurchschnittliche sportliche Aktivität der Patienten vor Beginn der Symptome (Klinge et al. 2010a).

Bis heute ist die Pathogenese der dysferlindefizienten Muskeldystrophie nicht vollständig verstanden. Immunhistochemisch lokalisiert Dysferlin in ausgereiften Zellen an die Plasmamembran (Anderson et al. 1999) und T-Tubuli (Kerr et al. 2013). Elektronenmikroskopische Bilder von dysferlindefizienten Muskelfasern zeigen einen erweiterten, irregulär geformten, z.T. longitudinal ausgerichteten T-Tubulusapparat (Klinge et al. 2010b). Dies deutet darauf hin, dass Dysferlin für Ausbildung und Erhalt der Membranen von Muskelzellen mitverantwortlich ist. So lokalisiert es während früher Stadien der Myogenese zunächst entlang des T-Tubulussystems, bevor es in ausgereiften Zellen zusätzlich entlang des Plasmalemmms zu finden ist (Klinge et al. 2007, Hofhuis et al. 2017, siehe Abbildung 3). Auch elektronenmikroskopische Untersuchungen frühester Muskelveränderungen aufgrund der Dysferlindefizienz zeigen Membranstabilitäten durch kleine plasmalemmale Defekte und Membranersatz durch mehrere Schichten kleiner Vesikel (Selcen et al. 2001).

Ergänzend hierzu kommt es bei Dysferlindefizienz zu einer fehlerhaften, verzögerten Regeneration beschädigter muriner Muskelfasern (Chiu et al. 2009, Roche et al. 2008). Unterstützt wird diese Beobachtung durch eine Interaktion zwischen Dysferlin mit alpha-

Tubulin (Azakir et al. 2010). Dieses Protein bildet den Hauptbestandteil der Mikrotubuli, die eine Einheit des Zytoskeletts bilden und hauptverantwortlich für die Organisation innerhalb der Zelle sind. Bei einem Zellmembrandefekt kommt es zu einer Neuordnung von Mikrotubuli um die defekte Stelle (Togo 2006). Genauso reichert sich Dysferlin während eines Reparaturvorgangs einer Membranverletzung um die unterbrochene Stelle an (Bansal et al. 2003, Bansal und Campbell 2004, Klinge et al. 2007).

Viele Proteine, die im Triadenkomplex angeordnet sind, kolokalisieren oder stehen in funktionellem Zusammenhang mit Dysferlin (siehe Abbildung 3). Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen von Caveolin3 sowie Mitsugumin53 (MG53) ebenfalls zu einer fehlerhaften Membranreparatur im murinen Skelettmuskel führen (Cai et al. 2009c). Da Dysferlin direkt mit MG53 und indirekt mit Caveolin3 in Verbindung steht (Matsuda et al. 2001, Flix et al. 2013) wird postuliert, dass ein Komplex aus Proteinen für die Membranreparatur verantwortlich ist. Ein enger Zusammenhang zwischen Caveolin3 und Dysferlin besteht zudem durch die funktionelle Verbindung beider Proteine zum DHPR. Denn wie Dysferlin kolokalisiert Caveolin3 mit dem DHPR (Couchoux et al. 2007). Dieser ist, wie in 1.1.3 beschrieben, verantwortlich für die elektromechanische Kopplung und daraus resultierendem Kalziumeinstrom in die Muskelzelle. Dieser Einstrom kann mittels Fluoreszenzmessungen als Amplitude dargestellt werden. In murinen Muskelzellen, in denen Dysferlin inaktiviert ist (Dysferlin-knockout-Zellen), kommt es nach Belastung neben einer erhöhten zytosolischen Kalziumkonzentration zu einer deutlichen Abnahme dieser Kalziumamplituden. Da dieser Prozess durch eine niedrige extrazelluläre Kalziumkonzentration oder die Hinzugabe von Diltiazem, einem L-Typ-Kalziumkanal-Hemmer, gemildert werden kann, ist anzunehmen, dass Dysferlin in Verbindung mit DHPR für die Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase mitverantwortlich ist (Kerr et al. 2013). Weitere funktionelle Gemeinsamkeiten weisen Dysferlin und Bin1 auf. Beide Proteine lokalisieren im Bereich des T-Tubulussystems (Anderson et al. 1999, Kerr et al. 2013, Butler 1997). Für beide Proteine wurde eine Funktion zur Ausbildung und Aufrechterhaltung tubulärer Strukturen nachgewiesen (Lee et al. 2002, Razzaq et al. 2001, Selcen et al. 2001, Klinge et al. 2010b). Weiter dienen beide Proteine der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase (Tjondrokoesoemo et al. 2011, Kerr et al. 2013). Diese Vielzahl an überschneidenden Eigenschaften legt synergistische Funktionen von Dysferlin und Bin1 nahe.



Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine kurative Therapie der Dysferlinopathien. Unterschiedliche Therapieansätze sind Gegenstand der aktuellen Forschung. dysferlindefiziente Muskulatur ist histologisch durch eine erhöhte Inflammation mit Infiltration insbesondere von Makrophagen, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen gekennzeichnet. Passend dazu zeigen die Infiltrate vermehrte Expression von MHC I-Molekülen (engl.: *major histocompatibility complex*, Fanin und Angelini 2002, Gallardo et al. 2001, Confalonieri et al. 2003). Diese Strukturen sind Teil der T-Zell-vermittelten Immunantwort und legen eine Involvierung der T-Zellen in die erhöhte Inflammation der Muskulatur dysferlindefizienter Muskeln nahe. Gegensätzlich zu der Annahme, dass T-Zellen verantwortlich für die Inflammation der Dysferlinopathien sind, ist eine Studie von Lerario et al. 2010 mit Rituximab. Rituximab ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD20<sup>+</sup> B-Zellen des Immunsystems. Eine Behandlung erbrachte bei 2 Patienten mit dysferlindefizienter Muskeldystrophie eine leichte Muskelkraftzunahme und legt ebenfalls eine Involvierung von B-Zellen nahe (Lerario et al. 2010). Aufgrund der vermehrten Infiltration von Makrophagen wurden Untersuchungen hinsichtlich ihrer Aktivitätskette durchgeführt. Ein wichtiger Bestandteil der Signalkette der Makrophagenaktivierung ist die Familie der Rho-Proteine (GTPase, RhoA, Rac1, Cdc42), deren Expression in dysferlindefizienten murinen Muskelzellen gesteigert ist (Nagaraju et al. 2008). Eine Hemmung der in dem Signalweg involvierten Rho-Kinase durch Fasudil reduziert zwar den Anteil infiltrierender Makrophagen im Muskelgewebe, erbringt jedoch keine Besserung hinsichtlich der Muskelregeneration oder Kraftverbesserung (Rayavarapu et al. 2010). Da belegt ist, dass ein erhöhter Kalziumeinstrom in die Zelle zu einem dystrophen Umbau der Zelle führen kann (Pan et al. 2004, Millay et al. 2009), wurden Versuche mit Dantrolen durchgeführt. Dantrolen hemmt den RyR und verhindert die Freisetzung von Kalzium aus dem SR (Krause et al. 2004). Bei einem Patienten mit einer Miyoshi-Myopathie aufgrund eines Dysferlinmangels führte Dantrolen zu einer Schmerzlinderung und senkte die zuvor deutlich erhöhte Kreatinkinase (Hattori et al. 2007).

Die Behandlung mit Glukokortikoiden führt bei einigen Muskeldystrophien, insbesondere bei der Muskeldystrophie Duchenne, zu einer klinischen und histopathologischen Verbesserung des Krankheitsbildes (Matthews et al. 2016). Eine ähnliche Verbesserung konnte in Studien mit Glukokortikoiden wie Deflazacort (Walter et al. 2013) oder Prednisolon (Sreetama et al. 2018) bei den Dysferlinopathien nicht erreicht werden. Hingegen führte eine Behandlung bei Dysferlindefizienz mit einem neuen, synthetisch

hergestellten Glukokortikoid, Vamorolon, zur Stabilisierung der Zellmembran, Verbesserung der Zellmembranreparatur, Erhöhung der Muskelkraft und Verminderung der Einwanderung von Fettzellen in die Muskulatur (Streetama et al. 2018). Vamorolon ist ein seit 2014 bekanntes Glukokortikoid, welches antiinflammatorisch und nicht mehr immunsuppressiv wirkt (Reeves et al. 2014). Die Nebenwirkungen der Langzeit-Steroidtherapie sollen daher reduziert sein.

Neben antiinflammatorischen Therapieversuchen gibt es experimentelle Studien zu Genersatztherapien. Diese gestalten sich aufgrund der Größe von Dysferlin (237 kDa, 55 Exone, 233140 Basenpaare) als schwierig und waren bisher nicht erfolgreich. Auch die Identifikation einer großen homozygoten Deletion bei Dysferlindefizienz und recht mildem Phänotyp und daraufhin Synthetisierung und heterologe Expression eines Minidysferlins konnte den voranschreitenden dystrophischen Umbau des Muskels nicht verhindern (Lostal et al. 2012, Krahn et al. 2010).

## 1.2 Fragestellung

Im Zuge der Forschung an Muskeldystrophien konnte belegt werden, dass eine Veränderung im Gleichgewicht der Kalziumhomöostase mit einem erhöhten oder unkontrollierten Kalziumeinstrom zu einem dystrophen Umbau von Skelettmuskulatur führt (Bellinger et al. 2008, Edwards et al. 2010, Millay et al. 2009). Die Lokalisation von Dysferlin im Bereich der T-Tubuli, legt einen Einfluss auf die Kalziumhomöostase nahe. In Bezug auf Dysferlinopathien ist bereits bekannt, dass Dysferlin bei der elektromechanischen Kopplung für die Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase mitverantwortlich ist (Kerr et al. 2013). Unklar ist, welchen Einfluss die Dysferlindefizienz auf den transsarkolemmalen Kalziumeinstrom (SOCE) hat. Dieser konnte bereits bei Versuchen mit dystrophindefizienten Mäusen (engl.: *X chromosome-linked muscular dystrophy, Mdx*) als erhöht nachgewiesen werden (Vandebrouck et al. 2002). Bei dieser Art der Muskeldystrophie kommt es zu einer stetig voranschreitenden Muskelschwäche. Gegensätzlich dazu beginnen die klinischen Symptome der dysferlindefizienten Muskeldystrophie deutlich später und nach einer vorangegangenen Phase erhöhter muskulärer Belastbarkeit. Aufgrund dieser klinischen Divergenz ist ein unterschiedlicher Einfluss auf die Kalziumhomöostase bei Dysferlinopathien zu erwarten.

In dieser Arbeit soll deshalb untersucht werden, welchen Einfluss Dysferlin auf den transsarcolemmalen Kalziumeinstrom ausübt. Die Proteine, die dem T-Tubulussystem zugeordnet sind, stehen häufig funktionell miteinander in Verbindung und beeinflussen ihre Expression. Aus diesem Grund untersucht diese Arbeit weiter, ob die Dysferlindefizienz einen Einfluss auf andere T-Tubulusproteine (mRNA- und Protein-Ebene) hat. Erkenntnisse darüber könnten neue Hinweise für die Entstehung der progredient verlaufenden Muskelerkrankung geben und Ansatzpunkte hinsichtlich therapeutischer Strategien bieten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Kalziumstrommessungen am Epifluoreszenzmikroskop

Zur Untersuchung der Auswirkung von Dysferlin auf die Kalziumhomöostase wurden Epifluoreszenzmessungen an isolierten Muskelzellen von Wildtyp- und Dysferlin-knockout-Mäusen angefertigt. Diese Methode ermöglichte eine Echtzeitmessung der Kalziumverteilung über den Triaden. Zur Überprüfung der Messmethode wurden zudem Messungen an Muskelzellen von Mdx-Mäusen durchgeführt, bei denen bereits ein erhöhter transsarkolemmaler Kalziueinstrom gezeigt werden konnte (Edwards et al. 2010, Vandebrouck et al. 2002). Die Messungen am Epifluoreszenzmikroskop wurden in Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. Lars Maier durchgeführt (UMG, Abteilung Kardiologie).

#### 2.1.1 Mausmodelle

Die Versuche erfolgten an Muskelzellen junger, männlicher Mäuse. Das Durchschnittsalter der Dysferlin-knockout-Mäuse lag bei 8,9 Wochen, der Wildtyp-Mäuse bei 12,6 Wochen und der Mdx-Mäuse bei 11,8 Wochen. Die Dysferlin-knockout-Tiere wurden von Kate Bushby (Newcastle, UK), die Mdx-Tiere von Jens Schmidt (UMG) zur Verfügung gestellt. Murine Muskelzellen altersentsprechender, männlicher Wildtyp-Tiere eigneten sich zur Erstellung der Kontroll- und Referenzwerte. Die Tiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) in der UMG gehalten und nach den Richtlinien des National Institutes of Health versorgt. In die Auswertung der Wildtyp-Muskelzellen gingen 29 Zellen von 8 verschiedenen männlichen Tieren ein ( $n=29$ ). Bei den Dysferlin-knockout-Muskelzellen waren es 27 Zellen von 8 Tieren ( $n=27$ ) und von den Mdx-Muskelzellen 15 Zellen von 5 Tieren ( $n=15$ ).

#### 2.1.2 Lösungen und Material

##### Chemikalien

BTS	in DMSO, Sigma
Koffein	Sigma
Fura-2 (AM)	in DMSO, MoBiTec

Isofluran	AbbVie
Kollagenase	Worthington
Laminin	Sigma
Pluronic F-127, 20% (w/v)	in DMSO, Sigma
Tapsigargin	Sigma-Aldrich
Verapamil hydrochlorid	Sigma

### Lösungen

Ringer Lösung mit Kalzium:	145 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	HEPES
	1 mM	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
	10 mM	Glucose
	2 mM	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
		pH 7,4

Ringer Lösung ohne Kalzium:	145 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	HEPES
	1 mM	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
	10 mM	Glucose
	0,5 mM	EGTA
		pH 7,4

Kollagenase Lösung: 4 mg/ml Kollagenase Typ 2 in Ringer Lösung mit Kalzium

Verapamil Lösung: 50 µM in Ringer Lösung mit Kalzium

Tapsigargin Lösung: 5 µM in Ringer Lösung ohne Kalzium

Farbstoff Lösung: 10 µM Fura-2 AM und 0,04% Pluronic F-127 in Ringer Lösung ohne Kalzium

### 2.1.3 Fluoreszenz-Setup

Für die Messungen wurde das Epifluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE300 Optical setup, IonWizard benutzt. Das Mikroskop projizierte die Bilder über die MyoCam auf den Computer, in dem sie mit dem Computerprogramm IonWizard von ION OPTIX aufgezeichnet wurden. Zur Auswertung der Messungen wurde die Software IONWizard Analyze Version 5.0 (ION OPTIX) verwendet.

Für Messungen am Epifluoreszenzmikroskop wurden fluoreszierende Farbstoffe benötigt. Zur Messung der Kalziumkonzentration in murinen Skelettmuskelzellen diente Fura-2-AM als Fluoreszenzfarbstoff. Fura-2 eignete sich als Kalzium bindender Fluoreszenzfarbstoff. Es war an Acetomethylester gebunden und konnte per Diffusion in die Zelle gelangen. Durch Abspaltung des AM-Anteils durch Esterasen wurde der Farbstoff in der Zelle reaktiv und konnte nicht mehr aus der Zelle heraus. Dies verhinderte störende Signale aus dem Zytoplasma. Gemessen wurde bei 340 und 380 nm. Dabei wurde freies Fura-2 bei 380 nm und gesättigtes, also an Kalzium gebundenes Fura-2, bei 340 nm gemessen. Stieg die intrazelluläre Kalziumkonzentration, verschob sich somit das Absorptionsmaximum von Fura-2. Dieses Verhältnis von 340/380 nm wurde als Ratio bezeichnet und ermöglichte eine Messung der Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Grynkiewicz et al. 1985).

### 2.1.4 Isolation von Skelettmuskelzellen

Die Gewinnung einzelner Skelettmuskelzellen orientierte sich an einer etablierten Methode nach Capote et al. 2005. Nach vollständiger Narkotisierung der Tiere mit Isofluran und Durchtrennung des zervikalen Rückenmarks wurde der Flexor Digitorum Brevis (FDB) Muskel an den Hinterfüßen herausgetrennt und für 50 Minuten bei 37°C in einer Kollagenaselösung inkubiert. Dieses führte zur proteolytischen Ablösung der Muskelzellen von den Sehnen. Nach Herauswaschung der Kollagenaselösung mittels Ringerlösung mit Kalzium konnte der Muskel durch auf und ab pipettieren in einzelne Zellen aufgetrennt und auf Messkammern, die jeweils mit 2 µl des Bindungsproteins Laminin beschichtet waren, verteilt werden. Zum Absinken der Zellen wurden sie bei Raumtemperatur für 30 Minuten stehen gelassen. Nach Verwerfung des Überstandes erfolgte die Inkubation in Fura-2 Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Lichteinstrahlung.

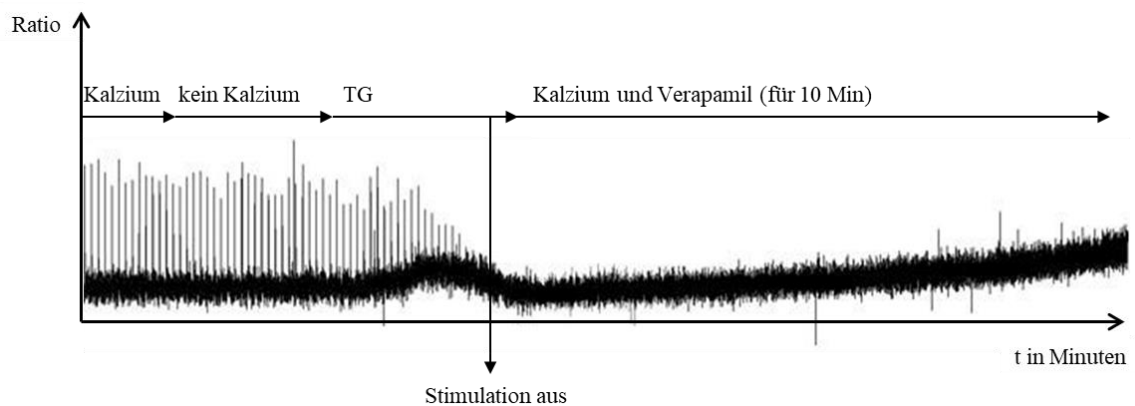
### 2.1.5 Messung des transsarkolemmalen Kalziumeinstroms

Die Messungen am Epifluoreszenzmikroskop zur Erfassung des transsarkolemmalen Kalziumeinstroms in die murine Muskelzelle wurden neben Muskelzellen von Mäusen vom Dysferlin-knockout-Typ (Dysf<sup>tm1Lcam</sup>, Dysferlin-knockout-Maus) mit Muskelzellen von Wildtyp-Kontrollmäusen und Mdx-Mäusen durchgeführt und verglichen.

Die Messungen fanden bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer statt, in der rotes Licht als Lichtquelle diente. Die Aufzeichnung auf dem Computer geschah durch das Programm IonWizard, von ION OPTIX.

Nach Anschalten der Geräte wurde die Kammer mit den isolierten Muskelzellen auf die Halterung am Mikroskop aufgebracht. Die Vergrößerung erfolgte mit einem 40-fachem Öl-Immersionsobjektiv. Alle Lösungen dieses Versuches erhielten 20  $\mu$ M BTS (N-Benzyl-p-toluenesulfonamide), ein Kontraktionshemmstoff, der die MHC II blockierte, (Pinniger et al. 2005), da sich in Probeversuchen gezeigt hatte, dass die zum Teil starke Muskelfaserkontraktion zur Ablösung der Zellen von der Kammer führen konnte. Bevor die Messung startete, wurde der Zulauf auf der einen Seite der Kammer mit Ringer Lösung mit Kalzium auf 90 ml/h gestellt, auf der anderen Seite die Pumpe für den Ablauf angestellt und die Stimulation auf 20 mV und 1 Hz eingestellt. Die erste Messung erfolgte ohne Farbstoffbeladung der Kammer, um die Eigenfluoreszenz der Zelle feststellen und später bei der Auswertung von den farbstoffbeladenen Zellen abziehen zu können. Nach Aufsuchen einer geeigneten Zelle, lief die Messung für 60 Sekunden. Die darauffolgenden Messungen erfolgten, wie in 2.1.4 beschrieben, nach 20-minütiger Inkubation der Kammern in Fura-2 AM-Lösung. Bevor die Aufzeichnung der Messung am Computer begann, wurden die Kammern zunächst für einige Minuten mit Ringer Lösung ohne Kalzium gespült, um den überschüssigen, ungebundenen Farbstoff von der Kammer zu waschen. Anschließend konnte mit einer geeigneten Zelle, deren Kontraktion anhand der Kalziumamplitude festgestellt wurde, die Messung gestartet werden. Für die ersten 60 Sekunden der Messung lief die Ringer Lösung mit Kalzium, um die Kontraktion der Muskelzelle unter regulären Bedingungen aufzuzeichnen. Danach wurde auf Ringer Lösung ohne Kalzium umgestellt und damit dem Medium das Kalzium entzogen. Die Lösung lief entweder bis sich die Kalziumamplituden deutlich verkleinerten oder maximal für 300 Sekunden. Um sicher zu gehen, dass nicht nur das Medium, sondern auch die Zelle mit ihrem Kalziumspeicher, dem SR, frei von Kalzium waren, schloss sich die Hinzugabe von Thapsigargin in einer Konzentration von 5  $\mu$ M, an. (Lytton et al. 1991). Thapsigargin diente als ein irreversibler

Inhibitor von SERCA (siehe 1.1.3) einer Ionenpumpe, die Kalzium in das SR zurück transportiert. Mit Thapsigargin konnte das bei jeder Kontraktion frei werdende Kalzium nicht mehr in das SR aufgenommen werden und wurde über das Sarkolemm aus der Zelle geschleust. Dies führte zu einer Abnahme der Kalziumamplituden. Erreichte die Ratio die Baseline (Basisfluoreszenz der Zelle), war die Zelle Kalzium frei. Die Stimulation wurde abgestellt und der transsarkolemmale Kalziueinstrom in die Zelle für 10 Minuten mit einer Verapamil Lösung mit Kalzium beobachtet und die Fluoreszenz aufgezeichnet. Verapamil ist ein L-Typ-Kalziumkanal-Antagonist mit dessen Hinzugabe der Einstrom von Kalzium über den DHPR Rezeptor (siehe 1.1.3) verhindert wurde.



#### **Abbildung 5: Darstellung der Epifluoreszenzmessungen im murinen Skelettmuskel**

Schematische Darstellung der Messung des Kalziueinstroms in eine murine Skelettmuskelzelle. Die mit Fura-2-AM beladene Zelle wurde unter kontinuierlicher Stimulation mit Ringer Lösung ohne Kalzium und 5  $\mu\text{M}$  Tapsigargin (TG), ein SERCA Antagonist, von Kalzium entleert. Anschließend Beendigung der Stimulation und wieder Hinzugabe von Ringer Lösung mit Kalzium sowie Verapamil, einem L-Typ-Kalziumkanal-Antagonisten. Die Auswertung der Messung des transsarkolemmalen Kalziueinstroms begann ab dem Zeitpunkt der Zugabe von Kalzium und Verapamil.

Die Erfassung der Daten für die Auswertung erfolgte anhand der minütlich erfassten ratiometrischen Werte, als Äquivalenz der zellulären Kalziumkonzentration. Die Messung und Aufzeichnung des Kalziueinstroms über die sarkolemmale Membran begann, nachdem die Zelle völlig Kalzium frei war und für 10 Minuten von einer Lösung aus Kalzium und Verapamil umspült wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die jeweilige Baseline der Zelle als Startwert auf 1 festgelegt und nachfolgende Werte entsprechend umgerechnet.



In Tabelle 3 sind die Versuchsgruppen sowie die einzelnen Muskelzellen, die zu den bestimmten Zeitpunkten in die Wertung mit eingeflossen sind, dargelegt. Während der Versuche kam es vereinzelt zum Ablösen der fixierten Zellen, vor allem bei den Zellen der Mdx-Muskelzellen. Da ein Ablösen der Zelle die ratiometrischen Werte beeinflusste und es deutliche Abweichungen zu den Werten der Zellen gab, die unbeeinträchtigt blieben, wurden die Zellen ab dem Zeitpunkt der Ablösung aus der Wertung genommen. Dies führte dazu, dass es mit voranschreiten der Versuche zu einer Abnahme der Zellzahl kam, die untereinander verglichen wurden.

**Tabelle 3: Übersicht der Versuchsgruppen**

<b>Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Muskelzellen</b>	<b>Min</b>	<b>Min</b>	<b>Min</b>	<b>Min</b>	<b>Min</b>	<b>Min</b>	<b>Min</b>	<b>Min</b>	<b>Min</b>	<b>Min</b>
<b>Maus</b>	<b>Mäuse</b>	<b>insgesamt <i>n</i></b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
Wildtyp	8	29	29	29	28	28	28	25	25	25	22	21
Dysferlin- knockout	8	27	27	27	27	27	24	24	23	21	21	19
Mdx	5	15	15	15	14	11	11	10	9	7	7	7

## 2.2 Quantitative *real time* PCR

Die Auswirkung der Dysferlindefizienz auf mRNA-Ebene der Triadenproteine im murinen Muskel wurden mittels quantitativer Messungen der mRNA ermittelt.

Die quantitative *real time* PCR (kurz qPCR) wurde im Labor von Prof. Dr. Thomas Paul durchgeführt (Abteilung Pädiatrische Kardiologie und Intensivmedizin, UMG).

Mit dieser Methode konnten PCR Produkte direkt während ihrer Bildung erfasst und quantitativ bestimmt werden. Dieses wurde durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht, welche an die zu amplifizierende DNA banden und gleichermaßen bei jedem Zyklus vervielfacht wurden. Dementsprechend war die Fluoreszenzaktivität proportional zu der Menge an gebildeten PCR-Produkten. Sie wurde in jedem Zyklus der PCR gemessen. Der  $C_T$ -Wert (engl.: *threshold cycle*,  $C_T$ ) entstand, sobald ein erhöhtes Fluoreszenzsignal im Vergleich zum Hintergrund gemessen wurde. Für eine absolute Quantifizierung wurde eine Standardkurve als externer Standard, die anhand von Verdünnungsreihen von *In vitro*-Transkripten erstellt werden konnte, benötigt. Danach wurden die  $C_T$ -Werte der Standardprobe und der unbekannt Probe bestimmt und anhand der erstellten Standardkurve konnte auf die Ausgangsmenge der unbekannt Probe geschlossen werden

(Bangsow et al. 2012). Für eine relative Quantifizierung wurde ein Verhältnis zwischen dem zu untersuchenden Gentranskript und einem sogenannten Housekeeping-Gen hergestellt (Radonić et al. 2005).

Die einzelnen Arbeitsschritte der qPCR wurden in die Extraktion der RNA, die Herstellung der cDNA und den Ablauf der qPCR unterteilt. Diese werden im Folgenden schrittweise erläutert.

### 2.2.1 Extraktion der RNA

Für die Methode der qPCR wurde die RNA aus dem Quadrizeps Femoris Muskel (QF) von jeweils 3 männlichen Dysferlin-knockout- und 3 Wildtyp-Mäusen isoliert. Die Extraktion der RNA aus Skelettmuskelfasern erfolgte nach der Arbeitsanleitung von PEQLAB Biotechnologie GmbH, peqGold TriFast™ in fünf Schritten. Nach Lysieren des Muskels mit einem Handhomogenisator und 800 µl peqGold TriFast folgte die Reinigung mit DEPC-Wasser und anschließender Ruhigstellung für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Durch 200 µl eiskaltes Chloroform und nachträglichem Schütteln der Probe für 15 Sekunden konnte die Voraussetzung zur Phasentrennung erreicht werden. Dazu wurde die Probe erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 10 Minuten zentrifugiert (12000xg, Raumtemperatur). Hierdurch bildeten sich drei Phasen: eine untere Phase, die DNA enthielt, eine Interphase, die Proteine enthielt und eine wässrige obere Phase, die RNA enthielt. Diese obere wässrige Phase wurde abgetragen, zur RNA-Präzipitation mit 500 µl 2-Propanol für 15 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend 10 Minuten zentrifugiert (12000 x g, 4°C). Nach dem Abnehmen des 2-Propanolüberstandes wurde die Probe zwei Mal mit 1 ml 75% Ethanol/25% DEPC-Wasser durch vortexen und darauffolgende 10-minütige Zentrifugation (12.000 x g, 4°C) gewaschen. Zum Lösen der RNA trocknete das Pellet zunächst an der Luft, wurde im Anschluss mit 20 µl DEPC-Wasser gemischt und zur besseren Lösbarkeit auf 55-60°C erhitzt.

Schließlich erfolgte die Kontrolle der RNA Konzentration, welche mit dem Spectrophotometer und dem Computerprogramm BioDoc Analyze 2.0 ermittelt wurde. Angestrebt war ein Wert >1 µg/µl.

#### Material und Arbeitsgeräte der RNA-Extraktion

peqGold TriFast™	peglab, 30-20XX
DEPC	Sigma

Chloroform	Merck KGaA
2-Propanol	Merck KGaA
Ethanol	Merck KGaA

#### DEPC-Wasser

DEPC ist ein starker Inhibitor für RNAsen. Die Herstellung erfolgte nach dem RNeasy®Mini Handbook von QIAGEN, September 2010. Zur Anwendung kam 0,1%iges DEPC-Wasser. Dieses wurde zunächst für 12 h bei 37°C inkubiert und anschließend für 15 Minuten autoklaviert.

Handhomogenisator:	TissueRuptor (Qiagen)
Zentrifuge:	Mikro 200 R (Hettich) 3-16P (Sigma)
Spectrophotometer:	Nanodrop®, ND-1000, V3.7.0, Thermo Scientific

### **2.2.2 Herstellung der cDNA**

Die cDNA Synthese fand mittels der Materialien und anhand der Anleitung des Superscript III, Invitrogen im Thermocycler statt. Die RNA-Konzentration wurde zunächst auf 1 µg/µl gebracht und dafür entsprechend mit DEPC-Wasser verdünnt. Nach Herstellung eines Mastermix 1 pro Probe wurde dieser im Thermocycler für 5 Minuten erhitzt und anschließend für 1 Minute auf Eis gelegt. Danach wurde zu dieser Probe 10 µl des Mastermix 2 pipettiert und im Thermocycler für 50 Minuten auf 50°C, anschließend für 5 Minuten auf 85°C erhitzt und schließlich wieder auf das Eis gelegt. Nach kurzer Zentrifugation und Hinzugabe von 1 µl von RNase H erfolgte ein letzter Zyklus für 20 Minuten bei 37°C im Thermocycler.

#### Material und Arbeitsgeräte der cDNA-Herstellung

Superscript III	Invitrogen
MasterMix 1:	1 µl RNA 1 µl Oligo-dT-Primer 1 µl dNTP Mix ad 10 µl Wasser

MasterMix 2:	2 $\mu$ l	10xRT buffer
	4 $\mu$ l	25 mM MgCl <sub>2</sub>
	2 $\mu$ l	0,1 M DTT
	1 $\mu$ l	RNaseOUT (40 U/ $\mu$ l)
	1 $\mu$ l	Superscript III RT (200/ $\mu$ l)

Thermocycler: t3000 Thermocycler (Biometra)

### 2.2.3 Ablauf der qPCR

Die qPCR erfolgte mit jeweils 3 Dysferlin-knockout-/ Wildtyp-Paaren und insgesamt 13 Proteinen. Die jungen Dysferlin-knockout-Tiere waren fünf, elf und zwölf Wochen alt, die Wildtyp-Mäuse für die spätere Auswertung altersentsprechend. Pro Tier und pro Protein wurde ein dreifacher Ansatz durchgeführt ( $n=9$ ).

Für jeden Ansatz wurde für jede erhaltene DNA eines Proteins der oben genannte Standardansatz mit SYBR Green Mix, dem forward und dem reverse Primer des Proteins und Wasser angesetzt. Der Standardansatz ergab ein Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l und wurde auf eine 96 Well-Platte pipettiert. Diese konnte ins *real time* PCR Detection System eingebracht werden. Verbunden mit der MyiQ-Software konnte die qPCR mit Zyklen zwischen einer und 30 Minuten gestartet werden (siehe Tabelle 5).

Zur Auswertung der qPCR wurden die drei durch die MyiQ-Software erhaltenen C<sub>T</sub>-Werte (siehe 2.2) pro Protein jeder Dysferlin-knockout- und Wildtyp-Skelettmuskelprobe herangezogen. Zunächst wurde der C<sub>T</sub>-Mittelwert der Dreifach-Ansätze gebildet und die Mittelwerte, die eine Standardabweichung von über 0,3 hatten, aus der Wertung genommen. Zur relativen Quantifizierung wurden die Proben mit einem Housekeeping-Gen (GAPDH, Kontroll-C<sub>T</sub>) verglichen und die Auswertung anhand des folgenden Schemas durchgeführt:

Bildung $\Delta C_T$ :	Wildtyp-C <sub>T</sub> - Kontroll-C <sub>T</sub> = $\Delta C_T$ Wildtyp
	Dysferlin-knockout-C <sub>T</sub> - Kontroll-C <sub>T</sub> = $\Delta C_T$ Dysferlin-knockout
Bildung $\Delta\Delta C_T$ :	$\Delta C_T$ Dysferlin-knockout - $\Delta C_T$ Wildtyp
	$2^{-(\Delta\Delta C_T)}$



Primer	OST	Sequenz
SERCA2 (metabion)	887 forward	5'- GAGAACGCTCACACAAAGACC -3'
	888 reverse	5'- CAATTCGTTGGAGCCCCAT -3'
NCX1 (metabion)	913 forward	5'- ACCAAGACGACGGTGAGAATC -3'
	914 reverse	5'- GTTATGGCCGCACACTTCAAT -3'
NCX3 (metabion)	915 forward	5'- CCTGAATTGTCTTCGAGCAGAG -3'
	916 reverse	5'- TCCCCAAGGGAAGGGTTCT -3'
DHPR=Cav1.1 (metabion)	917 forward	5'- TCAGCATCGTGGAATGGAAAC -3'
	918 reverse	5'- GTTCAGAGTGTGTTGTCATCCT -3'
TRPC3 (metabion)	919 forward	5'- TCGAGAGGCCACACGACTA -3'
	920 reverse	5'- CTGGACAGCGACAAGTATGC -3'
GAPDH (metabion)	79 forward	5'- CCCCACTAACATCAAATGGG -3'
	80 reverse	5'- CATCCACAGTCTTCTGGGT -3'

Tabelle 5: Zyklen der qPCR

Zeit	Temperatur (C°)	Phase	Wiederholungen
3 Minuten	95		1 x
10 Sekunden	95	Denaturierung	} 40 x
30 Sekunden	55	Annealing	
30 Sekunden	72	Extension	
1 Minute	95		3 x

## 2.3 Immunfluoreszenzen

Zur Untersuchung des Einflusses von Dysferlin auf die Protein-Ebene, der den Triaden zugeordneten Proteinen, wurden Fluoreszenzfärbungen der murinen Skelettmuskulatur angefertigt und Dysferlin-knockout- und Wildtyp-Muskelfasern verglichen.

### 2.3.1 Material für die Immunfluoreszenzen

#### Chemikalien

Kollagenase	Worthington
Laminin	Sigma
DMEM high Glucose	PAA Laboratories
Ethanol	Merck

BSA	Roth
Triton	Roth
Vectashield Hard Set Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories

### Lösungen

Kollagenase Lösung: 4 mg/ml Kollagenase Typ 2 in Ringer Lösung mit Kalzium

Fixierungslösung: 100% (v/v) Ethanol

Medium: DMEM high Glucose 10% FCS  
1% P/S  
1% L-Glut

PBS: 8 g NaCl  
0,2 g KCl  
1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,4

Blocklösung (in PBS): 5% (w/v) BSA  
0,5% (w/v) Triton

**Tabelle 6: Antikörper Immunfluoreszenzen**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Firma</b>
Junctophilin1	1:100	Kaninchen	Thermo, PA5-20640
Mitsugumin29	1:100	Kaninchen	Abcam, ab106438
Bin1	1:100	Maus	Santa Cruz, sc-103588
TRPC3	1:100	Kaninchen	Abcam, ab51560
FKBP12 (Calstabin1)	1:100	Kaninchen	Abcam, ab24373
DHPR	1:20	Ziege	Santa Cruz, sc-103588
Ryanodin1	1:100	Maus	Thermo, MA3-925, 34C
Orai1	1:100	Kaninchen	Abcam, ab59330
Dysferlin	1:10	Kaninchen	Abcam, ab15108

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Firma</b>
PMCA	1:250	Maus	Abcam, ab2825
SERCA	1:500	Maus	Abcam, ab2518
STIM1	1:100	Maus	BD Biosciences, 610954
Cy3 anti rabbit	1:100	Ziege	Jackson
Cy3 anti mouse	1:100	Esel	Jackson
AlexaFluor 488 anti rabbit	1:100	Ziege	Life technologies
AlexaFluor488 anti mouse	1:100	Esel	Life technologies

### Epifluoreszenzmikroskop

Axioimager M1 (Zeiss), Öl-Immersion-Objektiv Plan-Neofluar 100x/1.3. AxioCam HRm (Zeiss) und Axiovision 4.8 Software (Zeiss) wurden zur Auswertung der Bilder verwendet.

### **2.3.2 Kultivierung der FDB Fasern**

Für die Immunfluoreszenzen wurden Muskelfasern des Musculus Flexor digitorum brevis (FDB) aus weiblichen Dysferlin-knockout-Tieren, welche zwischen 13 und 18 Wochen und Wildtyp-Tieren, die zwischen 13 und 29 Wochen alt waren, isoliert. Nach Entnahme des FDB erfolgte die Auftrennung der Muskelfasern, wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben. Die Kollagenaselösung wurde mit DMEM high Glucose Medium herausgewaschen und die einzelnen Muskelzellen mit der Pipette aufgetrennt. Vor Auftragen der Zellen auf Deckgläser sind diese mit 5 µl Laminin beschichtet und zur Sterilisation für 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden. Zum Absinken standen die Zellen über Nacht in 0,5 ml Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Auf anschließendes Waschen mit kaltem PBS folgte die Fixation mit kaltem Ethanol bei -20°C für 20 Minuten. Es folgte erneutes Waschen mit PBS und 60-minütiges Inkubieren in der Blocklösung. Die Antikörper wurden mit Blocklösung verdünnt. Der erste Antikörper verblieb für 120 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur auf den Zellen und der zweite Antikörper für 90 Minuten. Nach Waschung der Zellen mit PBS erfolgte die Eindeckelung mit Vectashield Hard.

Die Erstellung der Bilder der Einzel- und Kofärbungen erfolgte bei abgedunkeltem Raum am Epifluoreszenzmikroskop. Nach aufsuchen einer jeweils geeigneten Zelle wurden die Bilder angefertigt und dekonvolutiert.



## 2.4 Statistische Analysen

Die Erstellung statistischer Analysen geschah mit Microsoft Excel 2010 sowie der GraphPad Prism 5 Software. Bei den transsarcolemmalen Kalziumstrommessungen (3.1) wurde eine univariate zweifaktorielle Varianzanalyse mit der GraphPad Prism 5 Software berechnet. Es erfolgten multiple Vergleiche der Ergebnisse der Gruppen (Wildtyp, Dysferlin-knockout, Mdx) mit der Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $\alpha = <0,05\%$ ), korrigiert nach Bonferroni (siehe Anhang, Tabelle A4).

Die Signifikanzüberprüfung der qPCR Ergebnisse (3.2) erfolgte durch einen *t*-Test für unabhängige Stichproben.

**Tabelle 7: statistische Signifikanzniveaus**

Signifikanzniveau		
$p = <0.05$	signifikant	(*)
$p = <0.01$	sehr signifikant	(**)
$p = <0.001$	höchst signifikant	(***)

## 2.5 Eigene Zeichnungen und Tabellen

Eigene Zeichnungen und Tabellen wurden mit dem Zeichenprogramm Inkscape 0.91 sowie Microsoft Office 13 angefertigt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Messungen des transsarkolemmalen Kalziumeinstroms

In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Ungleichgewicht der Kalziumhomöostase zu einem dystrophischen Umbau der Skelettmuskulatur führt (Bellinger et al. 2008, Pan et al. 2004). Dieses Ungleichgewicht kann durch die Beeinflussung unterschiedlicher Faktoren entstehen. Zu diesen gehören die elektromechanische Kopplung, der transsarkolemmale Kalziumeinstrom (SOCE-Mechanismus, Edwards et al. 2010) oder verschiedene Kalziumkanäle in der Skelettmuskulatur (Millay et al. 2009, Kargacin und Kargacin 1996, Cully et al. 2012). Über Dysferlin ist bereits bekannt, dass es Einfluss auf die elektromechanische Kopplung hat (Kerr et al. 2013). Unklar ist bisher, ob Dysferlin zu einer Veränderung des transsarkolemmalen Kalziumeinstroms führt, dessen Alteration bereits bei Mdx-Muskelzellen nachgewiesen werden konnte (Vandebrouck et al. 2013).

Um dieser These nachzugehen, wurden im Rahmen dieser Dissertation Kalziumstrommessungen am Epifluoreszenzmikroskop mit Muskelzellen von Wildtyp-Mäusen, Dysferlin-knockout-Mäusen und Mdx-Mäusen durchgeführt und verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels univariater zweifaktorieller Varianzanalyse. Insgesamt wurden über die drei Gruppen (Wildtyp, Dysferlin-knockout, Mdx) und über die Zeit (Minute 0 bis 10) 677 einzelne ratiometrische Messwerte erhoben. Die ratiometrischen Werte entstanden durch den Kalziumeinstrom in die Muskelzelle und bildeten den abhängigen Faktor der Varianzanalyse. Der erste unabhängige Hauptfaktor war die Gruppe (Wildtyp, Dysferlin-knockout, Mdx) der zweite unabhängige Hauptfaktor war die Zeit (Minute 0 bis 10). Durch die Auswertung der Varianzanalyse konnten die Effekte der beiden Hauptfaktoren und deren Interaktion analysiert werden.

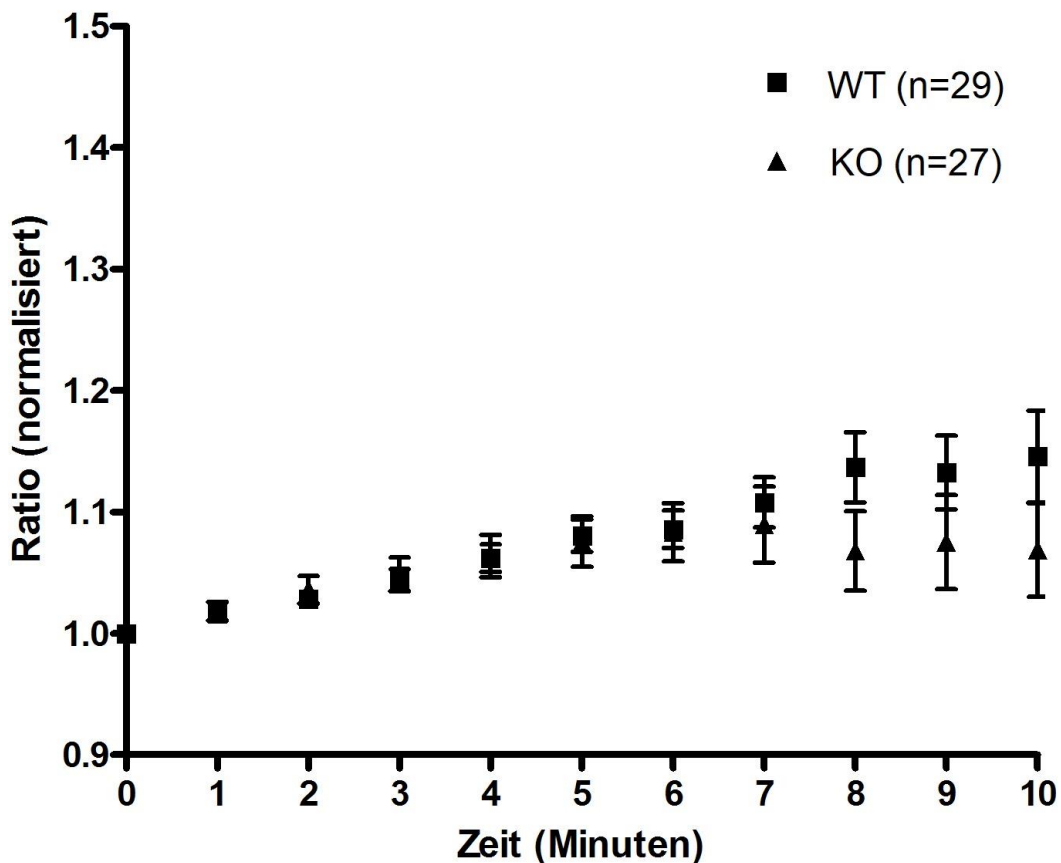
Es zeigte sich ein höchst signifikanter Effekt des Hauptfaktors Gruppe auf den Kalziumeinstrom in die murine Muskelzelle ( $F(2,644)=56,43$ ,  $p<0,0001$ ), welcher auf den signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen Wildtyp und Mdx ( $t(644)=9,264$ ,  $p<0,0001$ ) sowie Dysferlin-knockout und Mdx ( $t(644)=10,25$ ,  $p<0,0001$ ) zurückzuführen war. Zwischen den Gruppen Wildtyp und Dysferlin-knockout ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede ( $t(644)=1,448$ ,  $p=0,4443$ ).

Ebenso ergab sich anhand der Auswertung der Varianzanalyse ein höchst signifikanter Effekt des Hauptfaktors Zeit auf den Kalziumeinstrom in die murine Muskelzelle ( $F(10,644)=8,595$ ,  $p<0,0001$ ). Auch die Interaktion, der Wechselwirkungseffekt zwischen

den beiden Hauptfaktoren Gruppe und Zeit, ergab eine Signifikanz ( $F(20,644)=1,677$ ,  $p<0,05$ ). Eine detaillierte Darstellung der statistischen Ergebnisse befindet sich im Anhang Tabelle A1 bis A4. Alle Signifikanzen wurden nach Bonferroni korrigiert.

### **3.1.1 Die Dysferlindefizienz führte nicht zu einem signifikant erhöhten transsarkolemmalen Kalziumeinstrom in die dysferlindefiziente murine Muskelzelle**

Abbildung 6 zeigt die Auswertung des transsarkolemmalen Kalziumstroms im murinen Skelettmuskel in Dysferlin-knockout-Muskelzellen im Vergleich zu Wildtyp-Muskelzellen. In die Auswertung der Dysferlin-knockout-Muskelzellen gingen 27 Zellen von 8 männlichen Tieren ein ( $n=27$ ). Bei den Wildtyp-Muskelzellen waren es 29 Zellen von 8 männlichen Tieren ein ( $n=29$ ). Die Messungen liefen über 10 Minuten und minütlich wurden ratiometrische Werte und damit der transsarkolemmale Kalziumeinstrom, erhoben. Es zeigte sich ein stetiger transsarkolemmaler Kalziumeinstrom im Verlauf der Messungen beider Gruppen, der sich bis zur 6. Minute kaum sichtbar unterschied. Bei den Dysferlin-knockout-Muskelzellen zeigte sich eine Stagnation der ratiometrischen Werte ab der 7. Minute. Die ratiometrischen Werte der Wildtyp-Muskelzellen stiegen weiter an und zeigten bei Minute 10 einen sichtbar höheren Mittelwert des Kalziumeinstroms als die der Dysferlin-knockout-Muskelzellen (siehe Abbildung 6). Die multiplen Vergleiche der minütlich erfassten Mittelwerte ergaben jedoch keinen signifikanten Unterschied des Kalziumeinstroms zwischen den Zellen der Dysferlin-knockout-Mäuse und die der Wildtyp-Mäuse (siehe Anhang, Tabelle A2). Das Ergebnis war einhergehend mit der Auswertung des Gruppenfaktors der univariaten zweifaktoriellen Varianzanalyse, welcher ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen Dysferlin-knockout und Wildtyp ergab. Zusammenfassend konnte anhand der Epifluoreszenzmessungen kein signifikant veränderter Kalziumeinstrom in die murine Dysferlin-knockout-Muskelzelle im Vergleich zur Wildtyp-Muskelzelle festgestellt werden.



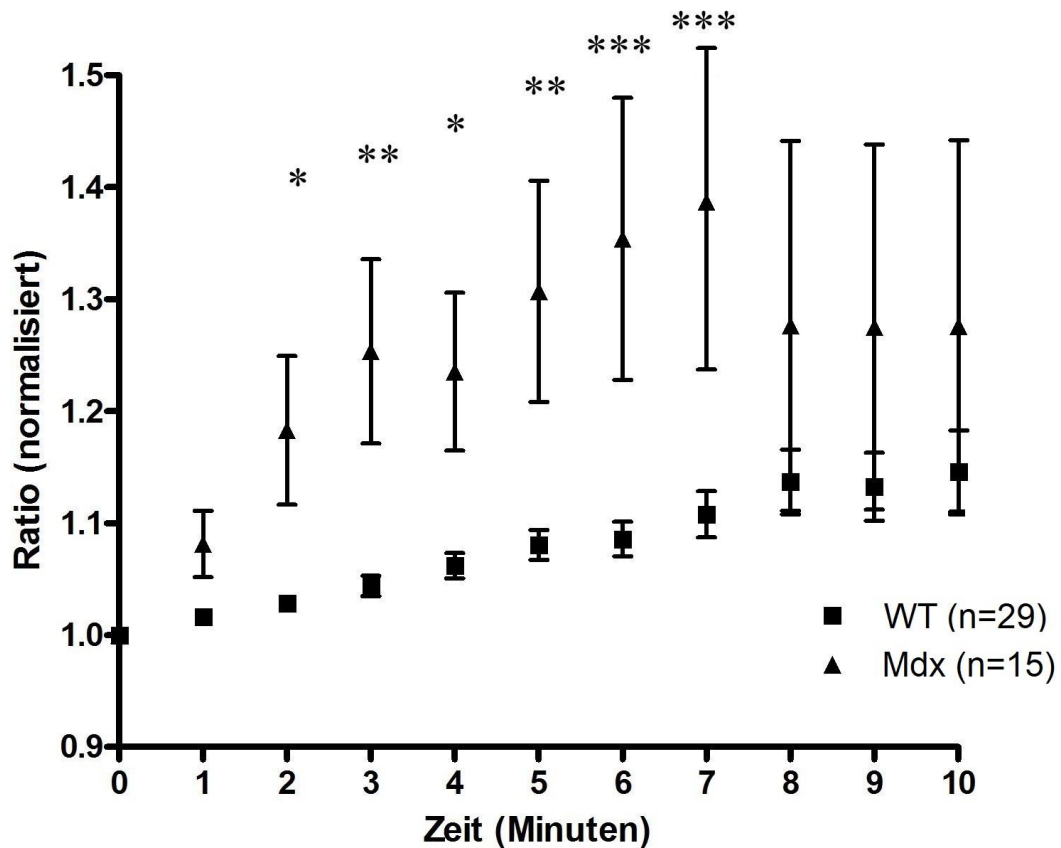
**Abbildung 6: Kalziueinstrom muriner Dysferlin-knockout- versus Wildtyp-Muskelzellen**

Messung des speichergesteuerten transsarkolemmalen Kalziueinstroms in Fura2-AM beladene murine Skelettmuskelzellen. Verwendet wurden murine Wildtyp-Muskelzellen (=WT,  $n=29$ ) und Dysferlin-knockout-Muskelzellen (knockout=KO,  $n=27$ ). Nach Entleerung der Zelle von Kalzium wurde die Wiederaufnahme von Kalzium, die transsarkolemmalen Kalziumströme, ab Minute 0 bis Minute 10 mittels ratiometrischer Werte gemessen. Minütlich wurden die ratiometrischen Werte der murinen Dysferlin-knockout und Wildtyp-Muskelzellen verglichen. Es bestand kein signifikanter Unterschied des transsarkolemmalen Kalziueinstroms über 10 Minuten zwischen murinen dysferlindefizienten Muskelzellen im Vergleich zu Muskelzellen der Wildtyp-Maus. Signifikanzniveau: \*  $=p<0,05$ , \*\*  $=p<0,01$ , \*\*\*  $=p<0,001$ .

Abbildung 7 zeigt die Auswertung des transsarkolemmalen Kalziumstroms im murinen Skelettmuskel in Mdx-Muskelzellen im Vergleich zu Wildtyp-Muskelzellen. In die Auswertung der Mdx-Muskelzellen gingen 15 Zellen von 5 Tieren ( $n=15$ ) und in die der Wildtyp-Muskelzellen 29 Zellen von 8 Tieren ( $n=29$ ) ein.

Zu sehen war ein stetiger Anstieg des transsarkolemmalen Kalziueinstroms in murine Wildtyp-Muskelzellen sowie ein im Vergleich deutlich erhöhter Kalziueinstrom bei den murinen Mdx-Muskelzellen. Die minütlich gemessenen Mittelwerte des Kalziueinstroms zwischen den murinen Mdx-Muskelzellen und den Wildtyp-Muskelzellen unterschieden

sich bei Minute 2 bis 7 signifikant (Minute 2:  $t(42)=3,098$ ,  $p<0,05$ ; Minute 3:  $t(40)=4,048$ ,  $p<0,01$ ; Minute 4:  $t(37)=3,107$ ,  $p<0,05$ ; Minute 5:  $t(37)=4,063$ ,  $p<0,01$ ; Minute 6:  $t(33)=4,571$ ,  $p<0,001$ ; Minute 7:  $t(32)=4,58$ ,  $p<0,001$ ). Es konnte demnach ein signifikant erhöhter transsarkolemmaler Kalziumeinstrom in murine Mdx-Muskelzellen im Vergleich zu murinen Wildtyp-Muskelzellen festgestellt werden. Bei Minute 8 bis 10 gab es weiterhin einen deutlich sichtbaren Unterschied der Mittelwerte der beiden Gruppen, jedoch waren die Vergleiche nach Bonferroni-Korrektur nicht signifikant (Minute 8:  $t(30)=2,083$ ,  $p=>0,05$ ; Minute 9:  $t(27)=2,094$ ,  $p=>0,05$ ; Minute 10:  $t(26)=1,904$ ,  $p=>0,05$ ). Das Absinken der Mittelwerte der Mdx-Muskelzellen ab Minute 7 wurde durch das Wegfallen abgelöster Zellen bei den darauffolgenden Messungen bedingt (Minute 8 bis 10  $n=7$ , siehe Tabelle 3).



**Abbildung 7: Kalziueinstrom muriner Mdx- versus Wildtyp- Muskelzellen**

Messung des speichergesteuerten transsarkolemmalen Kalziueinstroms in Fura2-AM beladene murine Skelettmuskelzellen. Verwendet wurden murine Wildtyp-Muskelzellen (=WT,  $n=29$ ) und Mdx-Muskelzellen (=Mdx,  $n=15$ ). Nach Entleerung der Zelle von Kalzium wurde die Wiederaufnahme von Kalzium, die transsarkolemmalen Kalziumströme, ab Minute 0 bis Minute 10 mittels ratiometrischer Werte gemessen. Minütlich wurden die ratiometrischen Werte der murinen Muskelzellen von Mdx- und Wildtyp-Mäusen verglichen. Es bestand ein signifikant erhöhter transsarkolemmaler Kalziueinstrom in die murinen Mdx-Muskelzellen im Vergleich zu den Zellen der Wildtyp-Mäuse bei Minute 2 bis Minute 7. Signifikanzniveau: \*  $=p<0,05$ , \*\*  $=p<0,01$ , \*\*\*  $=p<0,001$ .

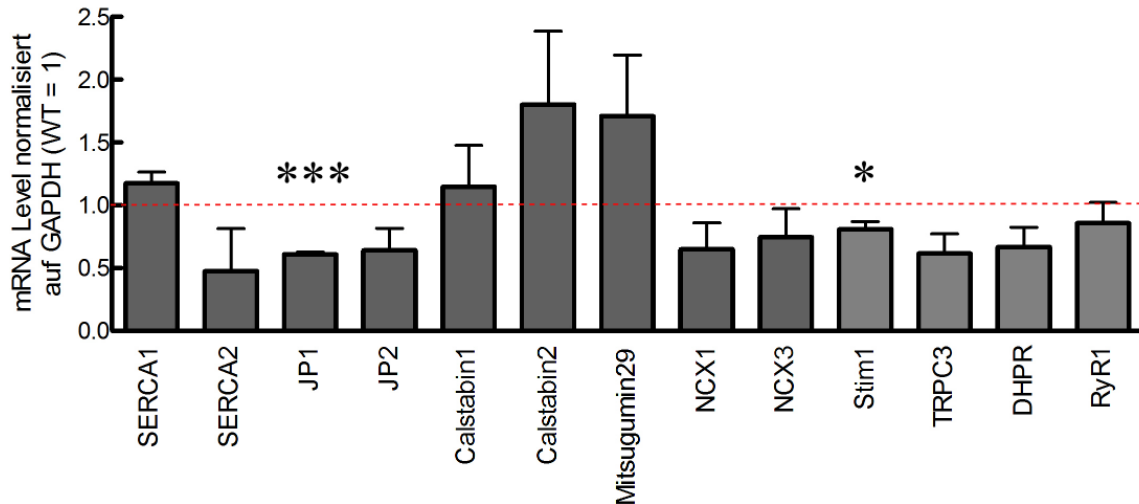
### 3.2 Quantitative *real time* PCR

Es konnte vielfach gezeigt werden, dass die Triadenproteine einander beeinflussen (siehe 1.1.3). Mittels quantitativer *real time* PCR sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss Dysferlin auf die RNA-Expression verschiedener Triadenproteine ausübt.

### 3.2.1 Dysferlin beeinflusste die RNA-Expression von Junctophilin1 und STIM1

Die qPCR erfolgte mit RNA aus murinen Skelettmuskelzellen von jeweils 3 Dysferlin-knockout-/ Wildtyp-Paaren. Jede Messung erfolgte mit einem dreifachen Ansatz, sodass sich pro Protein  $n=9$  ergab. Insgesamt wurden 13 Proteine untersucht. Die erhobenen  $C_T$ -Werte (engl.: *threshold cycle*,  $C_T$ ) der RNA wurden zur relativen Quantifizierung mit der RNA eines Housekeeping-Gens (GAPDH) und schließlich mit der zugehörigen Wildtyp-RNA verrechnet (siehe 2.2.3). Der Wert jeder Wildtyp-RNA konnte normalisiert als 1 angenommen werden. Anschließend wurden mittels  $t$ -Test die Messergebnisse der murinen Dysferlin-knockout-Muskelzellen mit denen der Wildtyp-Muskelzellen verglichen. Es wurden vorwiegend mRNA-Level der Proteine quantitativ untersucht, die einen Einfluss auf die Kalziumhomöostase (SERCA1 und 2, Calstabin1 und 2, Mitsugumin29, NCX1 und 3, STIM1, TRPC3, DHPR, RyR, siehe 1.1.4) oder die Triadenformation (Junctophilin1 und 2 und wiederum Mitsugumin29, siehe 1.1.4) haben. Die Auswertungen ergaben eine signifikant reduzierte mRNA-Expression im murinen Dysferlin-knockout-Muskel im Vergleich zum Wildtyp-Muskel für STIM1 ( $t(4)=-3,18$ ,  $p=0,03$ ). Auch die RNA für Junctophilin1 war im murinen Dysferlin-knockout-Muskel höchst signifikant vermindert exprimiert im Vergleich zum Wildtyp-Muskel ( $t(4)=-22,19$ ,  $p<0,001$ ).

STIM1 ist notwendig für die Aktivierung von SOCE. Eine reduzierte Expression führt demnach zu einer geringeren Aktivierung von Orai1 und einem verringerten Kalziumeinstrom in die murine Muskelzelle. Dieser möglicherweise verringerte Kalziumeinstrom deutete sich ebenfalls in den transsarkolemmalen Kalziumstrommessungen der Dysferlin-knockout-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen an (Abbildung 6). Die Ergebnisse der qPCR und der transsarkolemmalen Kalziumstrommessungen stimmten demzufolge überein. Die Auswertungen der qPCR-Messungen sind in Abbildung 8 dargestellt. Eine tabellarische Darstellung der Ergebnisse befindet sich im Anhang, Tabelle A5.



**Abbildung 8: RNA-Expression triadenassoziierter Proteine im murinen Dysferlin-knockout-Muskel im Vergleich zum Wildtyp-Muskel**

Darstellung der 13 Proteine mit denen eine qPCR durchgeführt wurde. Gemessen wurden die RNA-Level der triadenassozierten Proteine, die vorwiegend an der Kalziumhomöostase sowie der Triadenformation beteiligt sind. Der Wert jeder Wildtyp-RNA konnte nach Verrechnung mit dem Housekeeping-Gen (GAPDH) und dem zugehörigen Knockout-Paar normalisiert als 1 angenommen werden und ist für den direkten Vergleich als rot-gestrichelte Linie dargestellt (WT=1). Mittels *t*-Test wurden die RNA-Expression der murinen Dysferlin-knockout-Zellen ( $n=9$ ) mit den Wildtyp-Zellen verglichen. Die RNA-Expression von Junctophilin1 und STIM1 war im Vergleich zu murinen Wildtyp-Muskelzellen in Dysferlin-knockout-Muskelzellen signifikant vermindert. Signifikanzniveau: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 3.3 Analyse der Triadenproteinexpression im murinen Skelettmuskel anhand von Immunfluoreszenzen

Nach Untersuchung der Vorstufe der Proteine, der RNA, mittels quantitativer *real time* PCR, wurde anhand von Immunfluoreszenzfärbungen der Einfluss von Dysferlin auf die Triadenproteinexpression analysiert.

Die Fluoreszenzfärbungen der murinen Skelettmuskelfasern des Flexor Digitorum Brevis sind mit den in Tabelle 6 genannten Antikörpern für insgesamt 12 Triadenproteine in Einzel- und Kofärbungen durchgeführt worden. Die Färbungen mit Antikörpern gegen DHPR und PMCA zeigten keinen Unterschied im Fluoreszenzsignal zwischen murinen Wildtyp- und Dysferlin-knockout-Skelettmuskelfasern. Der Antikörper gegen FKBP12 (Calstabin1) ergab aufgrund einer fehlenden Bindung des Antikörpers kein Fluoreszenzsignal. Die TRPC3-Färbungen zeigten ein starkes Signal im Bereich der Verankerung der Aktinfilamente der Z-Linie bei alpha-Aktinin (vergleiche Anhang, Abbildung A1 mit Wei-LaPierre et al. 2013,

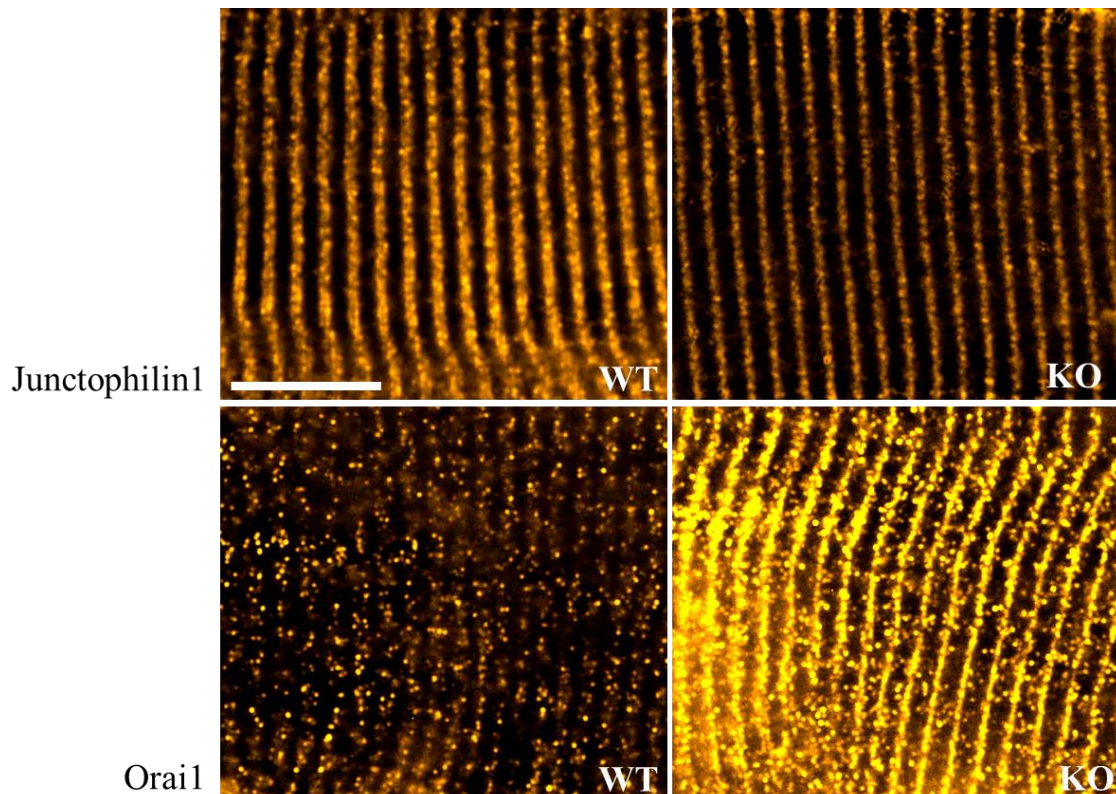


Figur 1). Dies deutete auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers hin, sodass die Färbungen in der Auswertung nicht berücksichtigt wurden. Die Färbungen mit den Antikörpern gegen Mitsugumin29, Bin1, SERCA und STIM1 zeigten qualitativ keine eindeutig verwertbaren Ergebnisse, sodass sie bei fehlender Genauigkeit nicht analysiert werden konnten.

### **3.3.1 Dysferlin beeinflusste das Fluoreszenzmuster von Junctophilin1 und Orai1 im murinen Skelettmuskel**

Neben einer verminderten mRNA-Expression von Junctophilin1 in murinen Dysferlin-knockout-Skelettmuskelfasern im Vergleich zum Wildtyp-Muskel deuteten auch die Immunfluoreszenzfärbung der murinen Skelettmuskelzelle auf einen Unterschied zwischen Dysferlin-knockout- und Wildtyp-Tieren hin (siehe Abbildung 9). Die Fluoreszenzbanden von Junctophilin1 im murinen Wildtyp-Muskel erschienen als zwei eng parallel nebeneinander verlaufende Linien. Die Fluoreszenzbanden von Junctophilin1 im Dysferlin-knockout-Muskelzellen wirkten im Vergleich schmaler und optisch weniger voneinander zu trennen. Sie erschienen vermindert kontinuierlich verlaufend im Vergleich zu den Wildtyp-Muskelzellen.

Die Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Orai1 erschien in der murinen Dysferlin-knockout-Muskelzelle im Vergleich zur Wildtyp-Zelle als deutlich verstärktes, linear verlaufendes Signal.

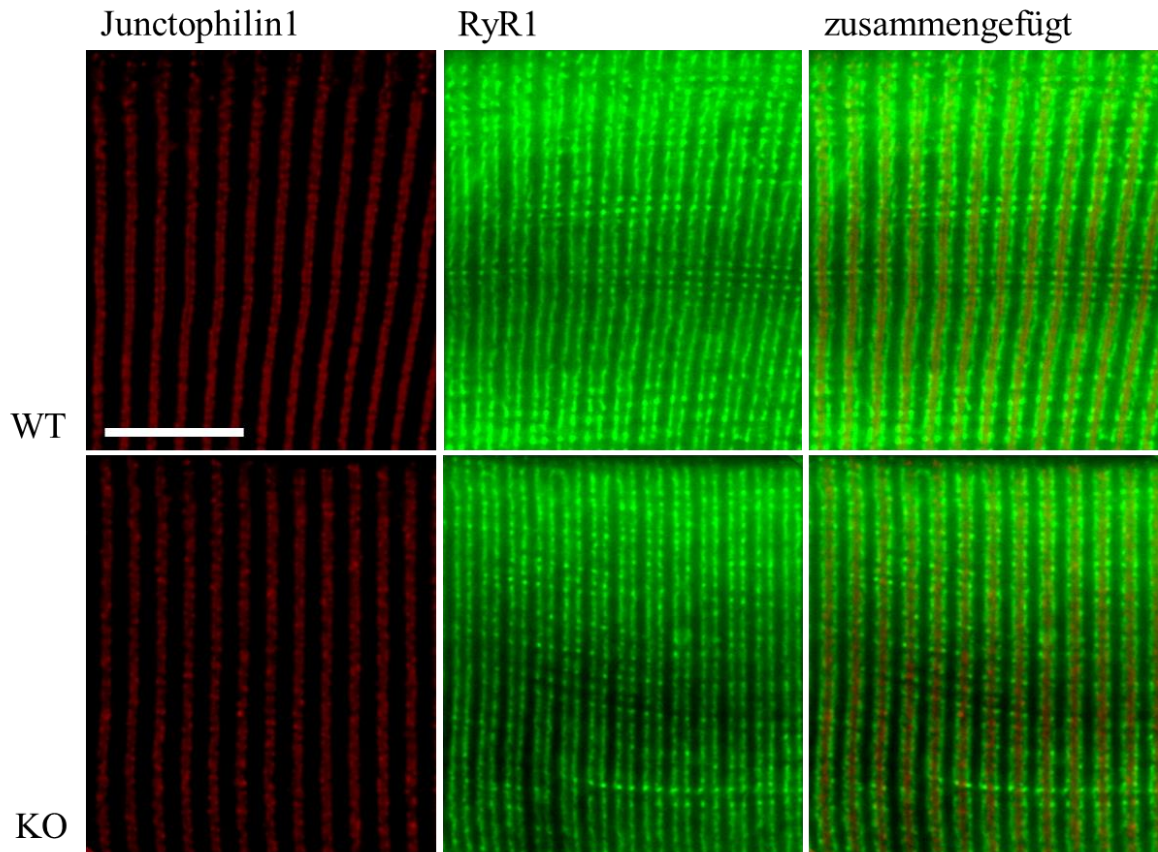


**Abbildung 9: Verändertes Fluoreszenzmuster im murinen Dysferlin-knockout-Muskel im Vergleich zum Wildtyp-Muskel für Juncctophilin1 und Orai1**

Immunfluoreszenzfärbungen mit Juncctophilin1 (oben) und Orai1 (unten). Links ist jeweils der Wildtyp-Muskel (=WT), rechts der Dysferlin-knockout-Muskel (=KO) abgebildet. Im Dysferlin-knockout-Muskel deuteten sich die parallel zueinander verlaufenden Fluoreszenzbanden für Juncctophilin1 schmäler und unterbrochener an als im Wildtyp-Muskel. Das Fluoreszenzmuster im murinen Skelettmuskel für Orai1 erschien im Dysferlin-knockout-Muskel im Vergleich zum Wildtyp-Muskel deutlich verstärkt. Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ .

### **3.3.2 Lokalisation von Juncctophilin1 ist in Dysferlin-knockout-Muskelzellen unverändert in Kofärbung mit RyR1**

In der Doppelfärbung mit Juncctophilin1 und RyR1 zeigte sich eine unveränderte Lokalisation von Juncctophilin1 in der murinen Dysferlin-knockout-Muskelzelle im Vergleich zur Wildtyp-Zelle (siehe Abbildung 10). Juncctophilin1 verlief in der Färbung der Wildtyp- sowie der Dysferlin-knockout-Skelettmuskelzelle im Bereich der Triaden zwischen jeder zweiten Linie des RyR1-Fluoreszenzmusters. Es bestand keine Kolo-kalisation der beiden Proteine. Die einzelnen Banden der Färbung von Juncctophilin1 erschienen erneut im murinen Dysferlin-knockout-Muskel schmäler und diskontinuierlicher verlaufend als im Wild-Typ Muskel.



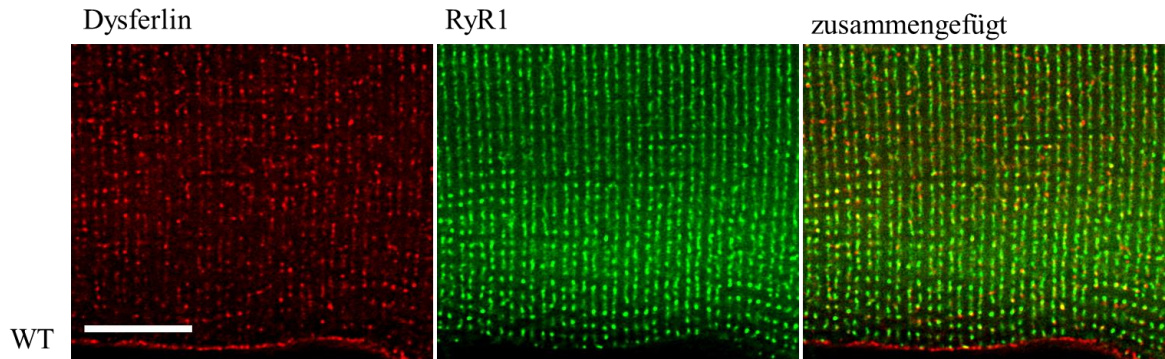
**Abbildung 10: Unveränderte Lokalisation von Junctophilin1 und RyR1 im Dysferlin-knockout-Muskel**

Immunfluoreszenzfärbung mit Junctophilin1 (rot), RyR1 (grün) und zusammengefügt in murinen Wildtyp- und Dysferlin-knockout-Skelettmuskelzellen. Oben jeweils der murine Wildtyp-Muskel (=WT), unten der Dysferlin-knockout-Muskel (=KO). Die Lokalisation von Junctophilin1 im Bereich der Triaden muriner Muskelzellen zeigte sich im KO im Vergleich zum WT nicht verändert. Das Fluoreszenzmuster von Junctophilin1 verlief in beiden Färbungen zwischen jeder zweiten Fluoreszenzlinie des RyR1-Antikörpers (siehe dritte Spalte). Die Banden der Junctophilin1-Färbungen erschienen im Dysferlin-knockout-Muskel erneut schmaler und weniger kontinuierlich verlaufend als im Wildtyp-Muskel. Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.3 Dysferlin kolokalisierte mit RyR1 entlang der Triaden

Die Lokalisation von Dysferlin konnte bereits auf den Bereich der Triaden sowie entlang der sakolemmalen Membran bestimmt werden (Klinge et al. 2007, Hofhuis et al. 2017). Überdies konnte eine Kolokalisation zwischen Dysferlin und dem DHPR nachgewiesen werden (Kerr et al. 2013), welche die Lokalisation von Dysferlin entlang der Triaden bestätigte. Die in dieser Arbeit angefertigten Immunfluoreszenzen belegten die partielle Kolokalisation von Dysferlin und RyR1, einem funktionellen Bindungspartner von DHPR

(siehe Abbildung 11). Dadurch konnten die vorherigen Forschungsergebnisse hinsichtlich der Lokalisation von Dysferlin im Skelettmuskel bestätigt werden.



### Abbildung 11: Kolokalisation von Dysferlin und RyR1 im murinen Skelettmuskel

Immunfluoreszenzfärbung mit Dysferlin und RyR1 in murinen Wildtyp-Skelettmuskelzellen (=WT). Bildliche Darstellung der Lokalisation von Dysferlin (=rot) im Bereich der Triaden der Skelettmuskelzelle sowie entlang des Sarkolemms, der Skelettmuskelfibrillen am unteren Bildrand. Ergänzend dargestellt die Lokalisation von RyR1 (=grün) im Bereich der Triaden. Zusammengefügt ergab sich eine erkennbare Kolokalisation von Dysferlin und RyR1 entlang der Triaden. Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Der Einfluss von Dysferlin auf die Kalziumhomöostase

Für jede Art von Bewegung durch muskuläre Kontraktion ist die präzise Veränderung der Kalziumkonzentration der Muskelzelle erforderlich. Dieses fein abgestimmte Ein- und Ausströmen von Kalzium ins Sarkoplasma wird als Kalziumhomöostase bezeichnet. Gerät die Kalziumhomöostase aus dem Gleichgewicht, kommt es nicht nur zu Bewegungsstörungen, sondern zu dauerhaften Muskelschäden und Einschränkung der muskulären Funktionen (Bellinger et al. 2008). Zur Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase existieren verschiedene Mechanismen. Diese können in ECC (engl.: *excitation contraction coupling*=elektromechanische Kopplung), SOCE (engl.: *store operated calcium-entry*=speichergesteuerte, transsarkolemmale Kalziumströme), Hinausschleusen von Kalzium durch Austauschkanäle sowie die Wiederaufnahme von Kalzium ins SR unterteilt werden (siehe 1.1.4).

Symptome von Muskeldystrophien sind dauerhafte Muskelschäden sowie eine voranschreitende Abnahme der muskulären Funktion (Cohn und Campbell 2000). Bei einigen Muskeldystrophien sind Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase verändert und somit möglicherweise an der Pathogenese dieser Erkrankungen beteiligt (siehe 1.1.8). Auch hinsichtlich Dysferlin ist bekannt, dass es an der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase beteiligt ist. Fehlt Dysferlin in der Muskulatur, zeigt sich eine veränderte Funktion des DHP-Rezeptors und folglich des ECC (Kerr et al. 2013). Unklar war bisher, ob die Dysferlindefizienz einen Einfluss auf den SOCE sowie die Expression verschiedener Triadenproteine hat.

#### 4.1.1 Speichergesteuerter, transsarkolemmaler Kalziumstrom (SOCE)

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben zeigt sich kein signifikanter Einfluss der Dysferlindefizienz auf den transsarkolemmalen Kalziumstrom der murinen Muskelzellen. Der Kalziumstrom in dysferlindefiziente murine Muskelzellen ist im Vergleich zu Wildtyp-Muskelzellen nicht erhöht. Er ist demnach nicht ursächlich für eine pathologisch erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration. Dieser fehlerhafte Mechanismus eines erhöhten transsarkolemmalen Kalziumstroms ist bisher im Mausmodell der dystrophindefizienten

Muskeldystrophie, der Mdx-Maus, nachgewiesen. Der erhöhte Kalziumeinstrom der Muskelzelle führt hier zu einer pathologisch erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration (Vandebrouck et al. 2013). In den in dieser Arbeit angefertigten Kontrollmessungen mit murinen Wildtyp- und Mdx-Muskelzellen (siehe Abbildung 7) konnte dieses Ergebnis wiederholt und damit die Messmethode validiert werden. Neben einem erhöhten Kalziumeinstrom durch den SOCE-Mechanismus in die Muskelzelle der Mdx-Maus zeigt sich passend dazu in Mdx-Muskelzellen eine Hochregulation von STIM1 und Orai1, der Proteine des SOCE-Mechanismus (Edwards et al. 2010). Da die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es bei dysferlindefizienten murinen Muskelzellen nicht zu einem erhöhten Kalziumeinstrom durch den SOCE-Mechanismus kommt, wurden die zugehörigen Proteine STIM1 und Orai1 ebenfalls untersucht. Es zeigt sich eine signifikant verminderte mRNA-Expression von STIM1 in dysferlindefizienten murinen Muskelzellen. STIM1 liegt in der Membran des SR. Sinkt bei Erregung der Zelle der Kalziumgehalt des SR, finden sich die STIM1 Moleküle zu Oligomeren zusammen (siehe 1.1.5) und aktivieren den in der T-Tubulummembran gelegenen Orai1-Kanal. Die Clusterung von STIM1 Proteinen mit anschließendem Kontakt zu Orai1 Proteinen ist demnach verantwortlich für die Aktivierung und den Ablauf von SOCE. Dieses bestätigen Versuche an der Myopathie mit tubulären Aggregaten (engl.: *tubular-aggregate Myopathy, TAM*). Ursächlich für diese Art der kongenitalen Myopathien sind Mutationen im STIM1-Gen. Diese Mutation führt zu einer Beeinträchtigung der Kalziumbindung von STIM1. Folge ist ein gesteigertes Clustering von STIM1 und Aktivierung von SOCE. Eine signifikante Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ist auch bei dieser Form der Myopathie zu finden (Böhm et al. 2013). Wenn STIM1, wie es in dieser Arbeit bei dysferlindefizienten murinen Muskelzellen gezeigt werden konnte, herunterreguliert ist, könnte dies bedeuten, dass weniger Orai1 Kanäle aktiviert werden und infolgedessen der Kalziumeinstrom in die Muskelzelle nicht erhöht oder sogar vermindert ist. Das Ergebnis der verminderten STIM1 Expression in der qPCR stimmt demnach mit dem Ergebnis der Kalziumstrommessungen am Epifluoreszenzmikroskop überein. Hier zeigt sich der Kalziumeinstrom in die murine Dysferlin-knockout-Muskelzelle im Vergleich zur Wildtyp-Muskelzelle sichtbar, jedoch nicht signifikant vermindert. Ursächlich dafür könnte die verminderte Expression von STIM1 in dysferlindefizienten Muskelzellen sein. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung von Orai1 deuten auf eine vermehrte Expression dieses Proteins in dysferlindefizienten Muskelfasern hin. Bei verminderter STIM1 Expression könnte die vermehrte Orai1 Expression eine kompensatorische Folge sein.

Da die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es bei der Dysferlindefizienz zu keinem gesteigerten SOCE-Mechanismus kommt, wurden weitere Triadenproteine untersucht, denen ein Einfluss auf SOCE nahegelegt wird. Die Familie der TRPC-Kanäle wird hinsichtlich SOCE viel diskutiert (Clapham 2003). So ist für einige Isoformen (TRPC 1,4 und 6) bekannt, dass sie den SOCE Mechanismus beeinflussen (Vandebrouck et al. 2002). Bei der Isoform TRPC3 gibt es jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Bei Zellen in denen TRPC3 direkt blockiert wurde, kann ein verminderter SOCE-Mechanismus nachgewiesen werden (Santillán et al. 2004). Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen zu TRPC3-knockout-Muskelzellen, die keinen veränderten SOCE-Mechanismus zeigen (Lee et al. 2006). Die Untersuchungen dieser Arbeit für TRPC3 im dysferlindefizienten Muskel zeigen auf mRNA- und Proteinebene keinen Unterschied der Dysferlin-knockout- und Wildtyp-Zellen.

Ein weiteres Protein der Triaden, welches Einfluss auf den SOCE-Mechanismus hat, ist Mitsugumin29. In Mitsugumin29-knockout-Zellen ist der SOCE-Mechanismus herunterreguliert. Es kommt zu einem verminderten Kalziumeinstrom in die Zelle (Pan et al. 2002). Die Expression von Mitsugumin29 in der dysferlindefizienten Muskelzelle zeigt sich anhand der qPCR Ergebnisse nicht vermindert und kann daher nicht als Erklärung für den möglicherweise leicht verminderten Kalziumeinstrom durch den SOCE-Mechanismus in dysferlindefizienten Muskelzellen herangezogen werden.

Für die Versuche am Epifluoreszenzmikroskop wurden Muskelzellen von jungen dysferlindefizienten Mäusen (9-12 Wochen alt) verwendet. In jungen Tieren führt demnach der SOCE-Mechanismus nicht zu einem signifikant erhöhten Kalziumeinstrom und kann in dem Alter nicht für die Pathogenese der Dysferlindefizienz herangezogen werden. Wie bereits beschrieben, unterscheiden sich die Dysferlinopathien in ihrer Klinik von anderen Muskeldystrophien durch die häufig überdurchschnittliche Sportlichkeit der Patienten vor Symptombeginn (Klinge et al. 2010a). Diese anamnestischen Angaben der Patienten sind anhand von Daten eines Laufradexperiments mit Mäusen objektiviert worden (Hofhuis 2013). Hier zeigt sich, dass junge dysferlindefiziente Mäuse bis zur 12 Lebenswoche signifikant schneller und weiter laufen können, als altersentsprechende Wildtyp-Tiere. Zudem kommt es in Skelettmuskelzellen dysferlindefizienter Mäuse nach elektrischer Stimulation zu einer signifikant erhöhten Kalziumfreisetzung ins Sarkoplasma im Vergleich zu Wildtyp-Muskelzellen. Im Gegensatz dazu ist die Kalziumfreisetzung ins Sarkoplasma von Mdx-Muskelzellen signifikant reduziert (Hofhuis 2013). In Zusammenschau dieser Ergebnisse könnte es einen Zusammenhang zwischen sportlicher Ausdauer und

Kalziumfreisetzung ins Sarkoplasma geben. Weiter könnten die überdurchschnittliche Kalziumfreisetzung sowie der nicht gesteigerte transsarkolemmale Kalziumstrom ursächlich für die spät einsetzende Klinik mit vorangehender guter sportlicher Aktivität der dysferlindefizienten Muskeldystrophie sein. Dies bestätigen Versuche mit dysferlindefizienten Mäusen, die älter als 80 Wochen waren. Bei gleicher Messmethode gibt es hier einen signifikant erhöhten Kalziumeinstrom in die Muskelzellen dysferlindefizienter Mäuse (nicht publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe). Somit könnte hier ein spät einsetzender erhöhter Kalziumeinstrom mitverantwortlich für die spät einsetzende Klinik mit progredientem Verlauf sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern weitere Hinweise zur Erforschung der Pathogenese der Dysferlindefizienz. Der klinische Unterschied zwischen Dysferlinopathien und anderen Muskeldystrophien wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit auf molekularer Ebene bestätigt. Unklar bleibt jedoch, welcher Mechanismus Auslöser des dystrophen Umbaus des Dysferlindefizienz ist.

#### **4.1.2 Excitation contraction coupling (ECC)**

Die elektromechanische Kopplung im Skelettmuskel (engl.: *excitation contraction coupling, ECC*) beschreibt die Übertragung eines Nervenpotentials auf den Muskel. Die Kontraktion entsteht durch das Einströmen von Kalzium ins Sarkoplasma durch den RyR. Dieser wird durch den durch das Nervenpotential aktivierten DHPR geöffnet. Dass Dysferlin in Verbindung mit diesem Komplex steht, konnte bereits durch die Kolo-kalisation mit dem DHPR im Skelettmuskel (Kerr et al. 2013) und durch die in dieser Arbeit durchgeführten Koimmunfluoreszenz mit RyR bestätigt werden. Ein weiteres wichtiges Protein dieses Komplexes ist Calstabin1. Es stabilisiert den RyR und verhindert die Entstehung sogenannter *leaky channels* (Bellinger et al. 2008), welche durch eine vermehrte Offenwahrscheinlichkeit die Kalziumhomöostase beeinträchtigen und zum dystrophen Muskelumbau führen. Diese Erkenntnisse führen zu der Frage, ob Dysferlin einen Einfluss auf die quantitative Expression dieser Proteine und damit einen Einfluss auf die elektromechanische Kopplung und folglich auch die Kalziumhomöostase hat. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qPCR Versuche mit DHPR, RyR1 und Calstabin1 zeigen jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der mRNA-Expression dieser Proteine im Dysferlin-knockout- und Wildtyp-Skelettmuskel. Auch die Immunfluoreszenzfärbungen von DHPR zeigen keinen Unterschied im Fluoreszenzmuster



(Daten nicht gezeigt). Der bereits nachgewiesene funktionelle Einfluss von Dysferlin auf den DHPR (Kerr et al. 2013) zeigt sich somit anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht auf der Ebene der mRNA oder der Proteine im murinen Skelettmuskel. Ebenfalls zeigt sich keine Veränderung des Partnerproteins, dem RyR1 oder dessen Stabilisierungsproteins Calstabin1. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Einfluss von Dysferlin auf die Proteine des RyR-/DHPR- Komplexes auf einer funktionellen Beeinflussung beruht.

#### **4.1.3 Wiederaufnahme von Kalzium aus dem Sarkoplasma**

Durch die steigende Kalziumkonzentration im Sarkoplasma der Muskelzelle kommt es zur Bindung zwischen Myosin- und Aktinfilamenten. Diese Bindung ist Voraussetzung für die Verkürzung und damit Kontraktion der Muskeln. Da Muskelbewegung ein dynamischer Prozess ist, der aus Anspannung und Entspannung der Muskulatur besteht, sind der Kalziumeinstrom und der Kalziumausstrom aus dem Sarkoplasma Voraussetzung für den Ablauf. Zur Ausschleusung von Kalzium aus dem Sarkoplasma und damit Relaxation der Skelettmuskelzellen sind vor allem die Proteine SERCA1, NCX3 und PMCA verantwortlich (siehe 1.1.3). Da eine Beeinträchtigung der Kalziumhomöostase bei Muskeldystrophien bereits in Zusammenhang mit einer Veränderung dieser Proteine gebracht werden konnte (Kargacin und Kargacin 1996, Cully et al. 2012), wurden diese Proteine in Bezug auf die dysferlindefiziente Muskeldystrophie mittels qPCR und Immunfluoreszenzmessungen untersucht.

SERCA1 schleust unter Verbrauch von ATP den Großteil des intrazellulären Kalziums zurück in das SR und ist maßgeblich verantwortlich für die Dauer der Entspannung, die Relaxation, der Muskulatur (Chemaly et al. 2013). Ist SERCA1 in seiner Funktion eingeschränkt, verlängert sich die Relaxationszeit der Muskulatur. Versuche an Mdx-Muskelzellen zeigen eine verminderte SERCA-Funktion (Kargacin und Kargacin 1996). Die Überexpression hingegen von SERCA1 führt zu einer Milderung des dystrophen Umbaus der Skelettmuskulatur von Scgd<sup>-/-</sup> sowie Mdx-Muskelzellen (Goonasekera et al. 2011). Zur Prävention eines dystrophen Umbaus der Skelettmuskulatur aufgrund eines erhöhten sarkoplasmatischen Kalziumgehalts ist demnach eine uneingeschränkte Funktion von SERCA1 erforderlich.

In den in dieser Arbeit durchgeführten qPCR-Untersuchungen von SERCA1 zeigt sich keine signifikant veränderte Expression in dysferlindefizienten Skelettmuskelzellen junger Mäuse (9-12 Wochen) im Vergleich zu altersentsprechenden Wildtyp-Tieren. Dieses Ergebnis

wurde einerseits durch Untersuchungen der Relaxationszeit dysferlindefizienter Muskelzellen und andererseits durch Western-Blot-Analysen hinsichtlich des Proteingehalts von SERCA1 bestätigt. Beide Untersuchungen ergeben keinen Unterschied zwischen Dysferlin-knockout- und Wildtyp-Skelettmuskelzellen junger Mäuse (Hofhuis 2013). Auch die Untersuchungen der Proteine, welche für das Ausschleusen von Kalzium aus der Muskelzelle verantwortlich sind (NCX3 und PMCA), ergeben keine signifikante Veränderung in dysferlindefizienten Skelettmuskelzellen junger Mäuse. Die fehlende Beeinflussung der beiden Proteine ist durch Koffein-Experimente von dysferlindefizienten Skelettmuskelzellen bestätigt worden. Koffein führt bei schneller Applikation zur Öffnung des RyR. Kalzium wird ins das Sarkoplasma entlassen und die Zelle erregt. Das Kalzium, welches durch SERCA1 wieder ins SR gepumpt wird, wird sofort wieder durch den offenen RyR ins Sarkoplasma entlassen. Kalzium gelangt über die Kalziumkanäle NCX3 und PMCA aus der Zelle heraus. Die Relaxationszeit bei Koffeinexperimenten ist demnach das Zeitfenster zum Ausschleusen von Kalzium aus der Muskelzelle. Die Relaxationszeit ist somit ein Indikator für die Funktion von NCX3 und PMCA im Skelettmuskel. In Koffeinexperimenten zeigt sich entsprechend den qPCR Experimenten dieser Arbeit weder eine gesteigerte noch erniedrigte Aktivität von NCX3 oder PMCA in dysferlindefizienten Mäusen (Hofhuis 2013).

In Anbetracht dieser Ergebnisse hat die Dysferlindefizienz auf die Expression der Proteine, die zur Relaxation der Skelettmuskulatur beitragen, in jungen Muskelzellen keinen Einfluss. Diese Ergebnisse verdeutlichen erneut den Unterschied zwischen der dysferlindefizienten und der dystrophindefizienten Muskeldystrophie und könnten eine Erklärung für die spät einsetzende Symptomatik der Dysferlinopathien sein. Unklar bleibt jedoch weiterhin der Auslöser des dystrophen Umbaus der Skelettmuskulatur. Denn wie die bereits erwähnte verkürzte Muskelausdauer älterer dysferlindefizienter Mäuse im Laufradexperiment zeigt sich übereinstimmend eine verlängerte Relaxationszeit der Skelettmuskulatur älterer Tiere (Hofhuis 2013). Diese Ergebnisse deuten auf eine eingeschränkte Funktion von SERCA1 hin. Da Western-Blot-Untersuchungen keinen Hinweis auf eine verminderte Proteinexpression von SERCA1 liefern (Hofhuis 2013), sollten diese Ergebnisse mittels qPCR-Skelettmuskeluntersuchungen älterer, dysferlindefizienter Mäuse bestätigt werden (nicht publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe). In diesem Fall könnte bezüglich der Dysferlinopathien von einem voranschreitenden Funktionsverlust von SERCA1 ausgegangen werden, dessen Ursache unklar ist.

Hinsichtlich PMCA zeigt sich anhand dieser Arbeit kein Hinweis auf eine Beeinflussung durch eine Dysferlindefizienz. Passend dazu ergeben Koffeinexperimente keinen Anhalt für eine Funktionseinschränkung dieses Proteins bei Dysferlindefizienz (Hofhuis 2013). Im Unterschied dazu stehen Untersuchungen anderer Muskeldystrophien. In Mdx-Muskelzellen zeigt sich eine gesteigerte Aktivität dieser ATPase (Cully et al. 2012). Weiter kommt es bei Mdx-Muskelzellen zu einem gesteigerten transsarkolemalem Kalziumeinstrom (Vandebrouck et al. 2013), einer reduzierten Kalziumfreisetzung ins Sarkoplasma (Hofhuis 2013) und einer eingeschränkten SERCA1 Funktion (Kargacin und Kargacin 1996). Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass Mdx-Mäuse einen erhöhten intrazellulären Kalziumgehalt in den Skelettmuskelzellen haben. Die nachgewiesene gesteigerte Aktivität der PMCA in der Mdx-Muskelzelle könnte ein Kompensationsmechanismus zum vermehrten Hinausschleusen von Kalzium aus dem Sarkoplasma sein. Da die gleichen Versuche mit dysferlindefizienten Muskelzelle keine signifikanten Ergebnisse und damit keinen Anhalt für eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums geben, ist keine Beeinflussung der PMCA-Aktivität bei einer dysferlindefizienten Zelle anzunehmen.

## 4.2 Triadenformation

Die Triaden bestehen aus einem longitudinalen T-Tubulusapparat sowie seitlich angeordneten terminalen Zisternen des SR der Skelettmuskelzelle. Diesem Bereich der Zelle sind viele Proteine zugeordnet, die für die regelgerechte Ausrichtung und Spaltbildung der Triaden verantwortlich sind. Neben Dysferlin konnte für Bin1, Mitsugumin29 und Junctophilin1 bereits nachgewiesen werden, dass ein Ausfall dieser Proteine zu einer veränderten Triadenmorphologie führt (Klinge et al. 2010b, Selcen et al. 2001, Lee et al. 2002, Komazaki et al. 2001, Komazaki et al. 2002, Ito et al. 2001). Zwischen den Proteinen der Triaden sind vielerlei funktionelle Interaktionen sowie Beeinflussungen der Expression bekannt (siehe 1.1.3). Dysferlin ist neben der T-Tubulusmembran auch an der Zellmembran der Skelettmuskelzellen lokalisiert. Dieses könnte auf unterschiedliche Funktionen hindeuten und legt Interaktionen mit anderen Proteinen, die den Triaden angeordnet sind, nahe.

#### 4.2.1 Dysferlindefizienz vermindert die Expression von Junctophilin1

Die mittels qPCR untersuchte mRNA-Expression der Proteine, die funktionell der Aufrechterhaltung der Triadenformation zugeordnet werden können (Junctophilin1 und 2 und Mitsugumin29), ergab eine höchst signifikante Verringerung für Junctophilin1 im murinen Dysferlin-knockout-Skelettmuskel im Vergleich zum Wildtyp-Muskel. Für Junctophilin1 sowie für Dysferlin ist bekannt, dass sie für die regelgerechte Ausbildung der Triaden notwendig sind (Ito et al. 2001, Klinge et al. 2010b, Hofhuis et al. 2017). Die Erniedrigung der mRNA-Expression von Junctophilin1 im dysferlindefizienten Skelettmuskel könnte demnach auf eine funktionelle Abhängigkeit dieser beiden Proteine bezüglich einer ordnungsgemäßen Ausbildung der Triadenformation hinweisen. Passend zu dieser Annahme zeigen sich die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen der murinen Skelettmuskelzellen, die im Zuge dieser Arbeit angefertigt wurden. Die Fluoreszenzmuster mit Antikörpern gegen Junctophilin1, welche im Wildtyp als zwei eng parallel verlaufende Banden im Skelettmuskel erscheinen, sind im Dysferlin-knockout-Muskel optisch weniger eindeutig voneinander zu trennen. Sie erscheinen schmaler und weniger kontinuierlich verlaufend als im Wildtyp-Muskel.

Hinsichtlich des Proteingehaltes von Junctophilin1 in dysferlindefizienten Muskelzellen gibt es Analysen anhand von Western-Blot-Experimenten. Diese zeigen eine unveränderte Expression für Junctophilin1 in jungen Dysferlin-knockout-Tieren, jedoch eine signifikant erniedrigte Expression in alten Dysferlin-knockout-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Hofhuis 2013).

In Zusammenschau der Ergebnisse der qPCR-Experimente dieser Arbeit und den bereits veröffentlichten Western-Blot-Experimenten (Hofhuis 2013) ergibt sich eine Diskrepanz. Die qPCR-Untersuchungen, welche die mRNA-Ebene dysferlindefizienter Muskelfasern analysieren, ergeben eine signifikant erniedrigte Expression für Junctophilin1. Die Western-Blot-Experimente, zeigen keinen Unterschied des Junctophilin1-Proteingehaltes junger dysferlindefizienter Muskelzellen verglichen mit Wildtyp-Muskelzellen. Ein erniedrigter Proteingehalt für Junctophilin1 zeigt sich erst in älteren dysferlindefizienten Tieren (Hofhuis 2013). Zur Aufdeckung dieser Diskrepanz könnten höhere Versuchszahlen sowie qPCR-Untersuchungen verschiedener Altersgruppen nützlich sein. Deutlich wird jedoch, dass es eine Beeinflussung zwischen Dysferlin und Junctophilin1 gibt, die auf ein Zusammenspiel diese beiden Proteine bezüglich der Triadenformation hindeutet. Die Lokalisation von Junctophilin1 innerhalb der Triaden wird dabei jedoch nicht von Dysferlin bestimmt. Die im

---

Rahmen dieser Arbeit angefertigte Koimmunfluoreszenz von Junctophilin1 und RyR1 zeigt eine unbeeinflusste Lokalisation von Junctophilin1 im Dysferlin-knockout-Muskel.

## 5 Zusammenfassung

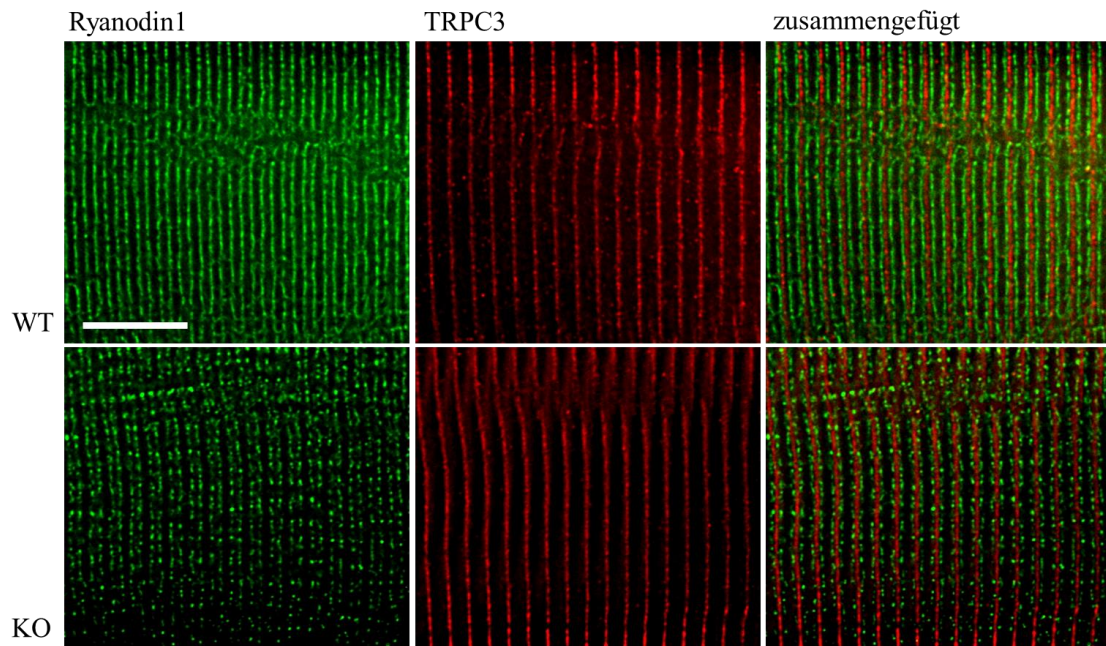
Dysferlinopathien bilden eine Gruppe genetisch bedingter, progressiver Muskelerkrankungen, deren Pathogenese bisher nur unzureichend verstanden ist. Klinische Symptome wie Muskelschwäche und Atrophie manifestieren sich meist in jungem Erwachsenenalter. Ein Alleinstellungsmerkmal dieser Erkrankungen innerhalb der Gruppe von Muskeldystrophien ist eine normale bis überdurchschnittliche Sportlichkeit der betroffenen Patienten, bevor es zum Auftreten von klinischen Symptomen kommt. Diese Merkmale lassen Unterschiede hinsichtlich der Pathogenese vermuten. Eine wichtige Komponente der Ursachenforschung an Muskeldystrophien ist der Bereich der Triaden im Skelettmuskel. Durch eine Vielzahl von Proteinen kommt es hier zu eng regulierten Veränderungen der Kalziumkonzentration in der Muskelzelle, der Kalziumhomöostase, welche Voraussetzung für den präzisen Ablauf der Muskelkontraktion ist. Für verschiedene Muskeldystrophien konnten bereits fehlerhafte Abläufe bei der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase nachgewiesen werden. Zudem führt ein pathologisch erhöhter Einstrom von Kalzium zu einem dystrophen Umbau der Muskelzelle.

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Kalziummessungen von Mausmuskelzellen am Epifluoreszenzmikroskop wurde der Mechanismus des speichergesteuerten, transsarkolemmalen Kalziueinstroms (SOCE) bei dysferlindefizienten Mäusen detailliert untersucht. Es zeigte sich kein pathologisch erhöhter Kalziueinstrom in jungen dysferlindefiziente Muskelzellen. Diese Ergebnisse könnten eine Erklärung für das klinische Merkmal mit spät einsetzenden Symptomen der Dysferlinopathien sein.

Für viele weitere Proteine, die den Triaden der Muskelzelle zugeordnet sind, ist eine gegenseitige Beeinflussung bekannt. Aus diesem Grund wurde eine Vielzahl von Proteinen mittels quantitativer *real time* PCR (qPCR) und Immunfluoreszenz-Untersuchungen analysiert, bei denen bereits ein Einfluss auf die Kalziumhomöostase oder die Triadenformation nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass STIM1, das Startprotein von SOCE in jungen dysferlindefizienten Muskelzellen, signifikant im Vergleich zu Wildtyp-Muskelzellen vermindert ist. Übereinstimmend dazu konnte bei den Kalziumstrommessungen am Epifluoreszenzmikroskop kein erhöhter transsarkolemmaler Kalziueinstrom über die Zellmembran von dysferlindefizienten Muskelzellen festgestellt werden. Weiter zeigten die Ergebnisse der qPCR Untersuchungen, dass Junctophilin1 signifikant in dysferlindefizienten Muskelzellen vermindert ist. Für Dysferlin und Junctophilin1 konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie für die Ausbildung

und Aufrechterhaltung der Triaden erforderlich sind. Demnach könnte die verminderte Expression von Junctophilin1 in dysferlindefizienten Muskelzellen zur nachgewiesenen Membranstabilität im dysferlindefizienten Skelettmuskel beitragen.

## 6 Anhang



**Abbildung A1: Koimmunfluoreszenz von Ryanodin1 und TRPC3 im murinen Wildtyp- und Dysferlin-knockout-Skelettmuskel**

Die durchgeführte Koimmunfluoreszenz von Ryanodin1 (=grün) und TRPC3 (=rot) in murinen Wildtyp (=WT)- und Dysferlin-knockout (=KO)- Skelettmuskelzellen führt zu dem Verdacht einer unspezifischen Bindung des Antikörpers für TRPC3 im Bereich der Verankerung der Aktinfilamente der Z-Linie bei alpha-Aktinin.

**Tabelle A1: Univariate zweifaktorielle Varianzanalyse der Kalziumstrommessungen**

Faktoren	DF (Freiheitsgrade)	F-Wert	p-Wert	Signifikanzniveau
Gruppenfaktor	2	F(2,644)=56,43	<0,0001	***
Zeitfaktor	10	F(10,644)=8,595	<0,0001	***
Interaktionsfaktor	20	F(20,644)=1,677	0,0326	*

Abgebildet sind die Auswertungen der Gruppen-, Zeit- und Interaktionsfaktoren der Kalziumstrommessungen. Verglichen wurden die Ergebnisse der Gruppen Wildtyp, Knockout, Mdx.



**Tabelle A2: Univariate zweifaktorielle Varianzanalyse Wildtyp vs. Dysferlin-knockout**

Wildtyp vs. Knockout	Dysferlin- knockout (Mittelwert Ratio)	<i>n</i>	Wildtyp (Mittelwert Ratio)	<i>n</i>	<i>t</i> -Test	Signifikanzniveau
Minute 0	1	27	1	29	0	nicht signifikant
Minute 1	1,018	27	1,016	29	0,044	nicht signifikant
Minute 2	1,036	27	1,029	29	0,178	nicht signifikant
Minute 3	1,048	27	1,044	28	0,107	nicht signifikant
Minute 4	1,064	27	1,062	28	0,04	nicht signifikant
Minute 5	1,076	24	1,081	28	0,112	nicht signifikant
Minute 6	1,083	24	1,086	25	0,056	nicht signifikant
Minute 7	1,09	23	1,108	25	0,403	nicht signifikant
Minute 8	1,068	21	1,137	25	1,481	nicht signifikant
Minute 9	1,075	21	1,133	22	1,2	nicht signifikant
Minute 10	1,069	19	1,146	21	1,553	nicht signifikant

**Tabelle A3: Univariate zweifaktorielle Varianzanalyse Wildtyp vs. Mdx**

Wildtyp vs. Mdx	Mdx (Mittelwert Ratio)	<i>n</i>	Wildtyp (Mittelwert Ratio)	<i>n</i>	<i>t</i> -Test	Signifikanzniveau
Minute 0	1	15	1	29	0	nicht signifikant
Minute 1	1,081	15	1,016	29	1,302	nicht signifikant
Minute 2	1,183	15	1,029	29	3,098	* $p < 0.05$
Minute 3	1,253	14	1,044	28	4,084	** $p < 0.01$
Minute 4	1,235	11	1,062	28	3,107	* $p < 0.05$
Minute 5	1,307	11	1,081	28	4,063	** $p < 0.01$
Minute 6	1,354	10	1,086	25	4,571	*** $p < 0.001$
Minute 7	1,387	9	1,108	25	4,58	*** $p < 0.001$
Minute 8	1,276	7	1,137	25	2,083	nicht signifikant
Minute 9	1,275	7	1,133	22	2,094	nicht signifikant
Minute 10	1,276	7	1,146	21	1,904	nicht signifikant

**Tabelle A4: Bonferroni-Korrektur**

Gruppenvergleich	Differenz der Mittelwerte	Konfidenzintervall der Differenzen 95%	Korrigierter <i>p</i> -Wert	Signifikanzniveau
KO vs. WT	-0,01939	-0,05154 bis 0,01275	0,4443	nicht signifikant
Mdx vs. WT	0,1625	0,1204 bis 0,2047	<0,0001	****
Mdx vs. KO	0,1819	0,1393 bis 0,2246	<0,0001	****

**Tabelle A5: Signifikanzberechnung der qPCR**

Protein	Mittelwert	<i>t</i> -Test	<i>p</i> -Wert	Signifikanzniveau
Ryanodin 1	0,857	-0,870	0,43	nicht signifikant
STIM1	0,809	-3,180	0,03	* $p < 0.05$
Calstabin1	1,148	0,450	0,68	nicht signifikant
Calstabin2	1,802	1,380	0,24	nicht signifikant
Mitsugumin29	1,710	1,460	0,22	nicht signifikant
Junctophilin1	0,608	-22,190	<0,00	*** $p < 0.001$
Junctophilin2	0,642	-2,060	0,11	nicht signifikant
SERCA1	1,174	1,930	0,13	nicht signifikant
SERCA2	0,477	-1,550	0,20	nicht signifikant
NCX1	0,650	-1,680	0,17	nicht signifikant
NCX3	0,745	-1,130	0,32	nicht signifikant
DHPR	0,669	-2,130	0,10	nicht signifikant
TRPC3	0,615	-2,450	0,07	nicht signifikant

## 7 Literaturverzeichnis

- Al-Qusairi L, Laporte J (2011): T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skelet muscle* 1, 26
- Anderson LV, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J, Johnson MA, Bashir R, Britton S, Keers S et al. (1999): Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet* 5, 855–861
- Azahir BA, Di Fulvio S, Therrien C, Sinnreich M (2010): Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle. *PLoS One* 4, e10122
- Bangsow, T: Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: Jansohn M, Aigner A, Bade S, Bangsow T, Bopp T, Czubayko F, Dechert U, Deutsch U, Dierl, S, Drutschmann D, Engel H et al. (Hrsg.): *Gentechnische Methoden*. 5. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2012, 153-187
- Bansal D, Campbell KP (2004): Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol* 4, 206–213
- Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, McNeil PL, Campbell KP (2003): Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 6936, 168–172
- Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, Richard I, Marchand S, Bourg N, Argov Z et al. (1998): A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 1, 37–42
- Bashir R, Strachan T, Keers S, Stephenson A, Mahjneh I, Marconi G, Nashef L, Bushby KM (1994): A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Hum Mol Genet* 3, 455–457
- Bellinger AM, Reiken S, Dura M, Murphy P W, Deng SX, Landry DW, Nieman D, Lehnart SE, Samaru M, LaCampagne A et al. (2008): Remodeling of ryanodine receptor complex causes "leaky" channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 6, 2198–2202
- Betz RC, Schoser BG, Kasper D, Ricker K, Ramírez A, Stein V, Torbergesen T, Lee YA, Nöthen MM, Wienker TF et al. (2001): Mutations in *CAV3* cause mechanical hyperirritability of skeletal muscle in rippling muscle disease. *Nat Genet* 3, 218–219
- Block BA, Imagawa T, Campbell KP, Franzini-Armstrong C. (1988): Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol* 6, 2587–2600
- Böhm J, Chevessier F, Maves De Paula A, Koch C, Attarian S, Feger C, Hantaï D, Laforêt P, Ghorab K, Vallat JM et al. (2013): Constitutive activation of the calcium sensor *STIM1* causes tubular-aggregate myopathy. *Am J Hum Genet* 2, 271–278
- Brandt NR, Caswell AH (1999): Localization of mitsugumin 29 to transverse tubules in rabbit skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 2, 348–350
- Brenner B: Skelettmuskulatur. In: Klinke R, Pape HC, Silbernagl S: *Physiologie*, 5 Auflage; Thieme, Stuttgart 2005, 102-119
- Britton S, Freeman T, Vafiadaki E, Keers S, Harrison R, Bushby K, Bashir R (2000): The third human *FER-1*-like protein is highly similar to dysferlin. *Genomics* 3, 313–321
- Butler MH (1997): Amphiphysin II (*SH3P9*; *BIN1*), a Member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J Cell Biol* 6, 1355–1367

- Cai C, Masumiya H, Weisleder N, Matsuda N, Nishi M, Hwang M, Ko JK, Lin P, Thornton A, Zhao X et al. (2009a): MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat Cell Biol* 1, 56–64
- Cai C, Masumiya H, Weisleder N, Pan Z, Nishi M, Komazaki S, Takeshima H, Ma J (2009b): MG53 regulates membrane budding and exocytosis in muscle cells. *J Biol Chem* 5, 3314–3322
- Cai C, Weisleder N, Ko JK, Komazaki S, Sunada Y, Nishi M, Takeshima H, Ma J (2009c): Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *J Biol Chem* 23, 15894–15902
- Calderón JC, Bolaños P, Caputo C (2014): The excitation-contraction coupling mechanism in skeletal muscle. *Biophys Rev* 1, 133–160
- Capote J, Bolanos P, Schuhmeier RP, Melzer W, Caputo C (2005): Calcium transients in developing mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* 2, 451–464
- Capote J, DiFranco M, Vergara JL (2010): Excitation-contraction coupling alterations in mdx and utrophin/dystrophin double knockout mice: a comparative study. *Am J Physiol Cell Physiol* 5, C1077-C1086.
- Chemaly ER, Bober R, Adnot S, Hajjar RJ and Lipskaia L (2013): Sarco (Endo) plasmic reticulum calcium ATPases (SERCA) isoforms in the normal and diseased cardiac, vascular and skeletal muscle. *J Cardiovasc Dis Diagn* 3
- Chiu YH, Hornsey MA, Klinge L, Jørgensen LH, Laval SH, Charlton R, Barresi R, Straub V, Lochmüller H, Bushby K (2009): Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 11, 1976–1989
- Clapham DE (2003): TRP channels as cellular sensors. *Nature* 6966, 517–524
- Cohn RD, Campbell KP (2000): Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 10, 1456–1471
- Confalonieri P, Oliva L, Andretta F, Lorenzoni R, Dassi P, Mariani E, Morandi L, Mora M, Cornelio F, Mantegazza R (2003): Muscle inflammation and MHC class I up-regulation in muscular dystrophy with lack of dysferlin: an immunopathological study. *J Neuroimmunol* 1-2, 130–136
- Couchoux H, Allard B, Legrand C, Jacquemond V, Berthier C (2007): Loss of caveolin-3 induced by the dystrophy-associated P104L mutation impairs L-type calcium channel function in mouse skeletal muscle cells. *J Physiol* 580, 745–754
- Cully TR, Edwards JN, Friedrich O, Stephenson DG, Murphy RM, Launikonis BS (2012): Changes in plasma membrane Ca-ATPase and stromal interacting molecule 1 expression levels for Ca<sup>2+</sup> signaling in dystrophic mdx mouse muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 5, C567-C576
- Dirksen RT (2009): Checking your SOCCs and feet: the molecular mechanisms of Ca<sup>2+</sup> entry in skeletal muscle. *J Physiol* 587, 3139–3147
- Dotti MT, Malandrini A, Gambelli S, Salvadori C, de Stefano N, Federico A (2006): A new missense mutation in caveolin-3 gene causes rippling muscle disease. *J Neurol Sci* 1-2, 61–64
- Edwards JN, Friedrich O, Cully T R, von Wegner F, Murphy RM, Launikonis BS (2010): Upregulation of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in dystrophic mdx mouse muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 1, C42-50
- Emery AE (2002): The muscular dystrophies. *Lancet* 9307, 687–695
- Endo M (2009): Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev* 4, 1153–1176

- Endo M, Tanaka M, Ogawa Y (1970): Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* 5266, 34–36
- Fanin M, Angelini C (2002): Muscle pathology in dysferlin deficiency. *Neuropathol Appl Neurobiol* 6, 461–470
- Fill M, Copello JA (2002): Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 4, 893–922
- Flix B, de La Torre C, Castillo J, Casal C, Illa I, Gallardo E (2013): Dysferlin interacts with calsequestrin-1, myomesin-2 and dynein in human skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 8, 1927–1938
- Franzini-Armstrong C, Kenney LJ, Varriano-Marston E (1987): The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study. *J Cell Biol*, 49–56
- Gailly P (2012): TRP channels in normal and dystrophic skeletal muscle. *Curr Opin Pharmacol* 3, 326–334
- Gallardo E, Rojas-García R, de Luna N, Pou A, Brown R H, Illa I (2001): Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology* 11, 2136–2138
- Gazzerro E, Sotgia F, Bruno C, Lisanti M P, Minetti C (2010): Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *Eur J Hum Genet* 2, 137–145
- Golini L, Chouabe C, Berthier C, Cusimano V, Fornaro M, Bonvallet R, Formoso L, Giacomello E, Jacquemond V, Sorrentino V (2011): Junctophilin 1 and 2 proteins interact with the L-type Ca<sup>2+</sup> channel dihydropyridine receptors (DHPRs) in skeletal muscle. *J Biol Chem* 51, 43717–43725
- Goonasekera SA, Lam CK, Millay DP, Sargent MA, Hajjar RJ, Kranias EG, Molkenin JD (2011): Mitigation of muscular dystrophy in mice by SERCA overexpression in skeletal muscle. *J Clin Invest* 3, 1044–1052
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985): A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 6, 3440–3450
- Györke I, Hester N, Jones LR, Györke S (2004): The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys J* 4, 2121–2128
- Hattori H, Nagata E, Oya Y, Takahashi T, Aoki M, Ito D, Suzuki N (2007): A novel compound heterozygous dysferlin mutation in Miyoshi myopathy siblings responding to dantrolene. *Eur J Neurol* 11, 1288–1291
- Hofhuis J: Dysferlin and its role in the pathogenesis of muscular dystrophy. Diss. Göttingen 2013
- Hofhuis J, Bersch K, Büssenschütt R, Drzymalski M, Liebetanz D, Nikolaev VO, Wagner S, Maier LS, Gartner J, Klinge L et al. (2017): Dysferlin mediates membrane tubulation and links T-tubule biogenesis to muscular dystrophy. *J Cell Sci* 5, 841–852
- Hollingworth S, Zeiger U, Baylor SM (2008): Comparison of the myoplasmic calcium transient elicited by an action potential in intact fibres of mdx and normal mice. *J Physiol* 21, 5063–5075
- Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-García R, Palmer J, Gallano P, Baiget M, Matsuda C, Brown RH (2001): Distal anterior compartment myopathy. *Ann Neurol* 1, 130–134
- Ito K, Komazaki S, Sasamoto K, Yoshida M, Nishi M, Kitamura K, Takeshima H (2001): Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J. Cell Biol.* 5, 1059–1068

- Kargacin ME, Kargacin GJ (1996): The sarcoplasmic reticulum calcium pump is functionally altered in dystrophic muscle. *Biochim Biophys Acta* 1, 4–8
- Kerr JP, Ziman AP, Mueller AL, Muriel JM, Kleinhans-Welte E, Gumerson JD, Vogel SS, Ward CW, Roche JA, Bloch RJ (2013): Dysferlin stabilizes stress-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in the transverse tubule membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 51, 20831–20836
- Klinge L, Aboumoussa A, Eagle M, Hudson J, Sarkozy A, Vita G, Charlton R, Roberts M, Straub V, Barresi R (2010a): New aspects on patients affected by dysferlin deficient muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2, 946–953
- Klinge L, Harris J, Sewry C, Charlton R, Anderson L, Laval S, Chiu YH, Hornsey M, Straub V, Barresi R (2010b): Dysferlin associates with the developing T-tubule system in rodent and human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2, 166–173
- Klinge L, Laval S, Keers S, Haldane F, Straub V, Barresi R, Bushby K (2007): From T-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis. *FASEB J* 8, 1768–1776
- Komazaki S, Nishi M, Kangawa K, Takeshima H (1999): Immunolocalization of mitsugumin29 in developing skeletal muscle and effects of the protein expressed in amphibian embryonic cells. *Dev Dyn* 2, 87–95
- Komazaki S, Ito K, Takeshima H, Nakamura H (2002): Deficiency of triad formation in developing skeletal muscle cells lacking junctophilin type 1. *FEBS Lett* 1-3, 225–229
- Komazaki S, Nishi M, Takeshima H, Nakamura H (2001): Abnormal formation of sarcoplasmic reticulum networks and triads during early development of skeletal muscle cells in mitsugumin29-deficient mice. *Dev Growth Differ* 6, 717–723
- Krahn M, Wein N, Bartoli M, Lostal W, Courrier S, Bourg-Alibert N, Nguyen K, Vial C, Streichenberger N, Labelle V (2010): A naturally occurring human minidysferlin protein repairs sarcolemmal lesions in a mouse model of dysferlinopathy. *Sci Transl Med* 2, 50-69
- Krause T, Gerbershagen MU, Fiege M, Weisshorn R, Wappler F (2004): Dantrolene--a review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia* 4, 364–373
- Kurebayashi N, Ogawa Y (2001): Depletion of Ca<sup>2+</sup> in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca<sup>2+</sup> entry into mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* 1, 185–199
- Launikonis BS, Murphy RM, Edwards JN (2010): Toward the roles of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Pflugers Arch* 460, 813–823
- Lee EH, Cherednichenko G, Pessah IN, Allen PD (2006): Functional coupling between trpc3 and ryr1 regulates the expressions of key triadic proteins. *J Biol Chem* 15, 10042–10048
- Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, Ochoa GC, Farsad K, Wenk MR, de Camilli P (2002): Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 5584, 1193–1196
- Lek A, Evesson FJ, Sutton RB, North KN, Cooper ST (2012): Ferlins: regulators of vesicle fusion for auditory neurotransmission, receptor trafficking and membrane repair. *Traffic* 2, 185–194
- Lerario A, Cogiமானian F, Marchesi C, Belicchi M, Bresolin N, Porretti L, Torrente Y (2010): Effects of rituximab in two patients with dysferlin-deficient muscular dystrophy. *BMC Musculoskelet Disord*, 11, 157
- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones J, Myers JW, Ferrell JE, Meyer T (2005): STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol* 13, 1235–1241
- Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizberea JA, Hentati F, Hamida MB (1998): Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1, 31–36

- Lostal W, Bartoli M, Roudaut C, Bourg N, Krahn M, Pryadkina M, Borel P, Suel L, Roche JA, Stockholm D (2012): Lack of correlation between outcomes of membrane repair assay and correction of dystrophic changes in experimental therapeutic strategy in dysferlinopathy. *PLoS One* 5, e38036
- Luther PK (2009): The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J Muscle Res Cell Motil* 5-6, 171–185 (CC BY-NC 4.0)
- Lytton J (2007): Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers: three mammalian gene families control Ca<sup>2+</sup> transport. *Biochem J* 3, 365–382
- Lytton J, Westlin M, Hanley MR (1991): Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* 26, 17067–17071
- MacLennan DH, Wong PT (1971): Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 6, 1231–1235
- Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, Nonaka I, Arahata K, Brown RH (2001): The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 17, 1761–1766
- Matthews E, Brassington R, Kuntzer T, Jichi F, Manzur AY (2016): Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev* 5, CD003725
- Millay DP, Goonasekera SA, Sargent MA, Maillet M, Aronow BJ, Molkenin JD (2009): Calcium influx is sufficient to induce muscular dystrophy through a TRPC-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 45, 19023–19028
- Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA (1998): Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 4, 365–368
- Montell C (2005): The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 272, re3
- Nagaraju K, Rawat R, Veszelovszky E, Thapliyal R, Kesari A, Sparks S, Raben N, Plotz P, Hoffman EP (2008): Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *Am J Pathol* 3, 774–785
- Nalefski EA, Falke JJ (1996): The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* 12, 2375–2390
- Nguyen K, Bassez G, Krahn M, Bernard R, Laforet P, Labelle V, Urtizberea JA, Figarella-Branger D, Romero N, Attarian S (2007): Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol* 8, 1176–1182
- Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Pettersson C, Iwarsson E, Kingston H, Garnier JM, Biancalana V, Oldfors A (2007): Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet* 9, 1134–1139
- Nishi M, Mizushima A, Nakagawara K, Takeshima H (2000): Characterization of human junctophilin subtype genes. *Biochem Biophys Res Commun* 3, 920–927
- Nishi M, Sakagami H, Komazaki S, Kondo H, Takeshima H (2003): Coexpression of junctophilin type 3 and type 4 in brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1-2, 102–110
- Nisole S, Stoye JP, Saib A (2005): TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 10, 799–808
- Novák P, Soukup T (2011): Calsequestrin distribution, structure and function, its role in normal and pathological situations and the effect of thyroid hormones. *Physiol Res* 3, 439–452

- Pan Z, Hirata Y, Nagaraj RY, Zhao J, Nishi M, Hayek SM, Bhat MB, Takeshima H, Ma J (2004): Co-expression of MG29 and ryanodine receptor leads to apoptotic cell death. *J Biol Chem* 19, 19387–19390
- Pan Z, Yang D, Nagaraj RY, Nosek TA, Nishi M, Takeshima H, Cheng H, Ma J (2002): Dysfunction of store-operated calcium channel in muscle cells lacking mg29. *Nat Cell Biol* 5, 379–383
- Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington ED, Raunser S, Walz T, Garcia KC, Dolmetsch RE, Lewis RS (2009): STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* 5, 876–890
- Parness J, Bandschapp O, Girard T (2009): The myotonias and susceptibility to malignant hyperthermia. *Anesth Analg* 4, 1054–1064
- Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E (1997): Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol* 1, 137–154
- Phimister AJ, Lango J, Lee EH, Ernst-Russell MA, Takeshima H, Ma J, Allen P D, Pessah IN (2007): Conformation-dependent stability of junctophilin 1 (JP1) and ryanodine receptor type 1 (RyR1) channel complex is mediated by their hyper-reactive thiols. *J Biol Chem* 12, 8667–8677
- Pinniger GJ, Bruton JD, Westerblad H, Ranatunga KW (2005): Effects of a myosin-II inhibitor (n-benzyl-p-toluene sulphonamide, BTS) on contractile characteristics of intact fast-twitch mammalian muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 2-3, 135–141
- Ponting CP, Mott R, Bork P, Copley RR (2001): Novel protein domains and repeats in *Drosophila melanogaster*: insights into structure, function, and evolution. *Genome research* 12, 1996–2008
- Protasi F (2002): Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Front Biosci*, d650-8
- QIAGEN (2010): RNeasy®Mini Handbook, 4. Ausgabe.
- Radonić A, Thulke S, Bae HG, Müller MA, Siegert W, Nitsche A (2005): Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Camelpox virus and Cytomegalovirus infections. *Virology* 2, 7
- Rayavarapu S, Van der Meulen JH, Gordish-Dressman H, Hoffman EP, Nagaraju K, Knobloch SM (2010): Characterization of dysferlin deficient SJL/J mice to assess preclinical drug efficacy: fasudil exacerbates muscle disease phenotype. *PLoS One* 9, e12981
- Razzaq A, Robinson IM, McMahon HT, Skepper JN, Su Y, Zelhof AC, Jackson AP, Gay NJ, O’Kane CJ (2001): Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev* 22, 2967–2979
- Reddy BA, Kloc M, Etkin L (1991): The cloning and characterization of a maternally expressed novel zinc finger nuclear phosphoprotein (xnf7) in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1, 107–116
- Reeves EKM, Hoffman EP, Nagaraju K, Damsker JM, McCall JM (2013): VBP15: preclinical characterization of a novel anti-inflammatory delta 9,11 steroid. *Bioorg Med Chem* 8, 2241–2249
- Roche JA, Lovering RM, Bloch RJ (2008): Impaired recovery of dysferlin-null skeletal muscle after contraction-induced injury in vivo. *Neuroreport* 16, 1579–1584
- Santillán G, Baldi C, Katz S, Vazquez G, Boland R (2004): Evidence that TRPC3 is a molecular component of the 1alpha,25(OH)2D3-activated capacitative calcium entry (CCE) in muscle and osteoblast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1-5, 291–295



- Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, Gundersen K, LØmo T (1989): Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 3, 197–205
- Schiaffino S, Reggiani C (2011): Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 4, 1447–1531
- Selcen D, Stilling G, Engel AG (2001): The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology* 11, 1472–1481
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP (1999): Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 11, 7289–7304
- Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP (1996): Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. *J Biol Chem* 25, 15160–15165
- Spangenburg EE, Booth FW (2003): Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. *Acta Physiol Scand* 4, 413–424
- Sreetama SC, Chandra G, Van der Meulen, Jack H, Ahmad MM, Suzuki P, Bhuvanendran S, Nagaraju K, Hoffman EP, Jaiswal JK (2018): Membrane stabilization by modified steroid offers a potential therapy for muscular dystrophy due to dysferlin deficit. *Mol Ther* 9, 2231–2242
- Szpyt J, Lorenzon N, Perez CF, Norris E, Allen PD, Beam KG, Samsó M (2012): Three-dimensional localization of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits and of the II-III loop in the skeletal muscle L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *J Biol Chem* 52, 43853–43861
- Takei K, Slepnev VI, Haucke V, de Camilli P (1999): Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* 1, 33–39
- Takehima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Ueda M, Hanaoka M, Hirose T (1989): Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 6224, 439–445
- Takehima H, Shimuta M, Komazaki S, Ohmi K, Nishi M, Iino M, Miyata A, Kangawa K (1998): Mitsugumin29, a novel synaptophysin family member from the triad junction in skeletal muscle. *Biochem J* 331, 317–322
- Takehima H, Komazaki S, Nishi M, Iino M, Kangawa K (2000): Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol Cell* 1, 11–22
- Tjondrokoesoemo A, Park KH, Ferrante C, Komazaki S, Lesniak S, Brotto M, Ko JK, Zhou J, Weisleder N, Ma J (2011): Disrupted membrane structure and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in adult skeletal muscle with acute knockdown of Bin1. *PLoS One* 9, e25740
- Togo T (2006): Disruption of the plasma membrane stimulates rearrangement of microtubules and lipid traffic toward the wound site. *J Cell Sci Pt 13*, 2780–2786
- 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* 6, 1089–1096
- Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa D L, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R (2006): CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Science* 5777, 1220–1223
- Walter MC, Reilich P, Thiele S, Schessl J, Schreiber H, Reiners K, Kress W, Müller-Reible C, Vorgerd M, Urban P (2013): Treatment of dysferlinopathy with deflazacort: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Orphanet J Rare Dis*, 8, 1-15

- Wechsler-Reya RJ, Elliott KJ and Prendergast GC (1998): A role for the putative tumor suppressor bin1 in muscle cell differentiation. *Mol Cell Biol* 1, 566–575
- Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken SR, Deng SX, Vest JA, Cervantes D, Coromilas J, Landry D W, Marks AR (2004): Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science (New York, N.Y.)* 5668, 292–296
- Wei-LaPierre L, Carrell EM, Boncompagni S, Protasi F, Dirksen RT (2013): Orai1-dependent calcium entry promotes skeletal muscle growth and limits fatigue. *Nat Commun*, 4, 2805
- Welsch U: Muskelgewebe. In: Welsch U, Deller T: *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie*, 3. Aufl; Elsevier Urban & Fischer, München 2010, 152-167

## Internetquellen

- 1) <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/myosin.html>; abgerufen am 13.07.2018. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Sigma-Aldrich, Merck KGaA.

## **Danksagung**

Ich danke der Klinik der Kinder- und Jugendmedizin der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen für die Möglichkeit eine experimentelle Doktorarbeit in ihren Forschungslaboren durchzuführen zu können. Insbesondere Frau Prof. Dr. med. Jutta Gärtner, der Direktorin der Abteilung.

Ein besonderer Dank geht an meine Betreuer Herrn PD Dr. Lars Klinge und Herrn PD Dr. Sven Thoms, welche in konstruktiver Kritik meine Arbeit gestalteten und stets während und nach der Zeit im Forschungslabor der Pädiatrie II Ansprechpartner für mich waren.

Außerordentlich dankbar bin ich zudem für die enge und professionelle Betreuung durch Frau Dr. Julia Hofhuis, welche mich an die experimentelle Arbeit heranführte und jederzeit im Labor für Fragen und Hilfe zur Seite stand.

Ein weiterer Dank geht an die Forschungsgruppe der Abteilung Pädiatrie II der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen; insbesondere an Irmgard Cierny und Marc Ziegenbein, die mit ihrer Erfahrung in der Labormedizin eine unabdingbare Hilfe für mich waren.

Zudem danke ich Prof. Dr. Lars Maier für die Bereitstellung des Epifluoreszenzmikroskops zur Durchführung der Kalziummessungen im Labor der Abteilung Kardiologie I der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen.