

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

**Zur Rolle des Kationenkanals TRPM7 bei der  
Differenzierung von Muskelzellen**

---

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
(Dr. med.)  
der Universitätsmedizin  
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald**

**vorgelegt 2016  
von Mareike Carina Stoll  
geboren 24.10.1983 in Wetzlar**

**Dekan:** Professor Dr. rer. nat. Max P. Baur

**1.Gutachter:** Professor Dr. H. Brinkmeier

**2.Gutachter:** Professor Dr. C. de Witt

**Ort, Raum:** O 0.65/0.66 Innere Medizin A

**Tag der Disputation:** 14.12.2016

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>I. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Die Transient Rezeptor Potential Superfamilie.....	1
1.1.1. TRPC6.....	4
1.1.2. TRPM7.....	5
1.2. Vorkommen und Konzentrationen.....	7
1.3. Genstruktur sowie biologische, chemische und physikalische Eigenschaften.....	8
1.4. Zielstellung der Arbeit.....	10
<b>II. Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1. Materialien.....	11
2.1.1. Chemikalien.....	11
2.1.2. Zelllinien.....	13
2.1.3. Enzyme.....	13
2.1.4. Kits für die Molekularbiologie.....	13
2.1.5. Fotomaterialien.....	14
2.1.6. Zellkulturmedien.....	14
2.1.7. Verwendete Lösungen.....	14
2.1.8. Primer und Sonden.....	16
2.1.9. Antikörper.....	17
2.1.10. siRNAs.....	17
2.1.11. Geräte.....	18
2.2. Methoden.....	19
2.2.1. Vorbereitung der Zellkulturen / Zellernte.....	19
2.2.2. RNA- und Protein- Isolation.....	20
2.2.3. Umschreibung der RNA in cDNA.....	21
2.2.4. PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	22
2.2.5. Real-time quantitative PCR nach dem Taqman-Prinzip.....	23
2.2.6. Immunhistochemie.....	25
2.2.7. Proteinisolierung und -bestimmung / BCA-Assay.....	26
2.2.8. Western Blot.....	27
2.2.9. siRNA-Transfektion.....	29

<b>III.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
3.1.	Etablierung der siRNA-Transfektions-Methode: .....	32
3.1.1.	Transfektion mit fluoreszierender Alexa-RNA .....	32
3.1.2.	Nachweis des TRPC6-Knockdowns.....	33
3.1.2.1.	Nachweis von TRPC6 in HEK293-Zellen mittels RT-PCR.....	37
3.1.2.2.	Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6-Knockdowns in-situ .	38
3.1.2.3.	Nachweis von TRPC6-Knockdown mittels Western Blot .....	39
3.2.	Einfluss von TRPM7 auf die Muskeldifferenzierung .....	41
3.2.1.	ATP-Gehalt nach TRPM7-Knockdown durch siRNA.....	41
3.2.1.1.	Konzentrationsabhängigkeit .....	41
3.2.1.2.	Zeitabhängigkeit .....	43
3.2.2.	Quantifizierung von TRPM7 nach siRNA-Knockdown.....	45
3.2.2.1.	Konzentrationsabhängigkeit .....	45
3.2.2.2.	Zeitabhängigkeit .....	47
3.2.3.	Immunhistochemischer Nachweis von TRPM7-Knockdown in-situ.....	53
3.2.4.	Nachweis von TRPM7-Knockdown mittels Western Blot .....	54
3.3.	Differenzierung der C57Bl-Zellen nach TRPM7-Knockdown.....	55
<b>IV.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>70</b>
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>77</b>
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>VII.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>86</b>
<b>VIII.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>92</b>
<b>IX.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>93</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
Abt.	Abteilung
A. dest.	aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Ba <sup>2+</sup>	Bariumionen
BCA	Bicinchoninc acid
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaar
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
Cd <sup>2+</sup>	Cadmiumionen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Co <sup>2+</sup>	Cobaltionen
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
d	Tag
DAG	1,2-Diacylglycerine
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsRNA	double-stranded RNA
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
EMAU	Ernst-Moritz-Arndt-Universität
et al.	und Mitarbeiter
EtOH	Ethanol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum

## Abkürzungsverzeichnis

---

for	forward
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
Gly	Glycin
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HiP	HiPerFect Transfection Reagenz
IMO	immortalized control muscle cells
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
Lsg.	Lösung
LW	Leerwert
MagNuM	magnesium-nucleotide-regulated metall ion
max.	maximal
Med.	medizinische
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumionen
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mind.	mindestens
mM	milimolar
Mn <sup>2+</sup>	Manganionen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MuLV	Murine Leukemia Virus
MW	Mittelwert
Na-Acid	Natriumacid
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>v</sub> 1.4	spannungsgesteuerter Natriumkanal 1.4
Ni <sup>2+</sup>	Nickelionen
nm	Nanometer
nM	nanomolar
Nr.	Nummer
ns	nicht signifikant
nt	nucleotides

O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
rev	reverse
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RT	Raumtemperatur
RYR1	Ryanodinrezeptor 1
s	Sekunden
SA	Standardabweichung
SCN4A	sodium channel gene, voltage-gated, type IV, alpha subunit
SDS-Page	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SF	Standardfehler
si-1	siRNA Typ1=5
si-2	siRNA Typ2=7
si-K	Kontroll-siRNA
siRNA	small (short) interfering RNA
SL	Stock solution
SOC	store-operated channel
Sr <sup>2+</sup>	Strontiumionen
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Temp.	Temperatur
TRIS	tris-Hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	Transport-Ribonukleinsäure
TRPC6	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6 ("classical")
TRPM7	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7 ("melastatin")

## Abkürzungsverzeichnis

---

u.a.	unter anderem
u+HiP	untransfizierte Zellen mit HiPerFect behandelt
UMM	Universal Master Mix
untransf.	untransfiziert
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Zn <sup>2+</sup>	Zinkionen

## **I. Einleitung**

### **1.1. Die Transient Rezeptor Potential Superfamilie**

Die Entdeckung der TRP-Superfamilie von Kationenkanälen gelang durch eine mutierte Fruchtfliege, *Drosophila melanogaster*, die auf Lichtreize inadäquat reagierte (Montell et al., 1985). Hier kam es durch die genetische Mutation zu einer passageren (transienten) Antwort der Retinazellen auf Lichtreize, wohingegen der Wildtyp der *Drosophila* eine dauerhafte Depolarisation der Retinazellen unter Lichteinfall aufwies (Montell et al., 1985; Montell, 1, 2005; Lis et al., 2005). Nach molekulargenetischen Untersuchungen konnte das TRP-Gen als DNA-Fragment isoliert werden (Montell et al., 1985).

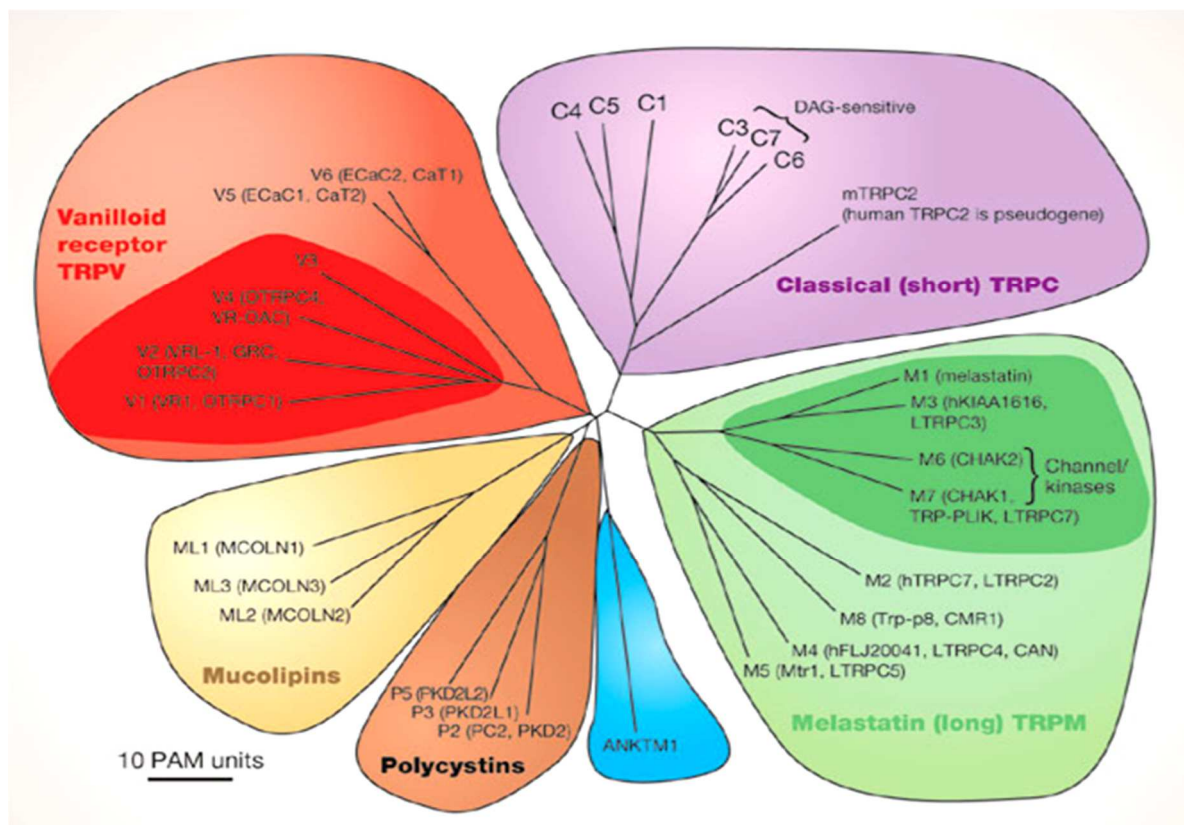
Die TRP-Familie besteht aus einer vielfältigen Gruppe von Kationenkanälen, welche in nicht erregbaren Zellen verschiedene Funktionen erfüllen (Montell, 1, 2005). Hierzu gehören Phototransduktion, Geschmack, Temperaturempfindlichkeit, Wahrnehmung der Osmolarität, Tastempfinden und Hörvermögen (Montell, 2, 2005).

Die Expression von TRP-Kanälen wurde in einer Vielzahl von Organismen wie Würmern, Fruchtfliegen, Zebrafischen, Mäusen und Menschen nachgewiesen (Venkatachalam und Montell, 2007).

Die TRP-Familie setzt sich aus sieben Unterfamilien von zellulären Ionenkanälen zusammen (Montell, 1, 2005). Alle haben sechs Transmembrandomänen und sind durchlässig für Kationen (Montell, 1, 2005). Jeweils vier Proteinuntereinheiten bilden in der Zellmembran einen Ionenkanal mit zentraler Pore (Homo- oder Hetero-Tetramere) (Montell, 2005).

Die TRPC-Proteine sind die klassischen („classical“) TRP´s, welche als Ionenkanäle der Plasmamembran in nicht erregbaren Zellen zu finden sind (Montell, 1, 2005). Zum einen können TRPC´s als sogenannte store-operated channels (SOC) fungieren oder über eine DAG-Aktivierung eröffnet werden (Montell, 1, 2005). Eine exozytotische Regulation dieser Kanäle ist ebenfalls möglich (Montell, 1, 2005). Die zweite Unterfamilie besteht aus TRPV-Kanälen mit sensorischen Funktionen, welche auf Hitze, Osmolaritätsschwankungen und mechanische Stimulation anspricht (Montell, 1, 2005). Die dritte Untergruppe besteht aus den TRPM-Kanälen (Montell, 1, 2005). In der vierten Untergruppe befinden sich die TRPN-Proteine, die für Mechanotransduktion verantwortlich sind (Montell, 1, 2005). Die Untergruppen vier

und fünf zeichnen sich beide durch viele Ankyrin-Repeats aus (Montell, 1, 2005). Die fünfte Gruppe besteht nur aus einem Vertreter, dem TRPA1, welcher für Kältereize zuständig ist (Montell, 1, 2005). Die sechste und siebte Unterfamilie, TRPP und TRPML, sind entfernt verwandt mit der ersten Unterfamilie (Montell, 1, 2005). Mutationen dieser Gruppen werden für verschiedene Erkrankungen verantwortlich gemacht (Montell, 1, 2005). Die Einteilung in die verschiedenen Subfamilien sind in Abbildung 1 dargestellt.



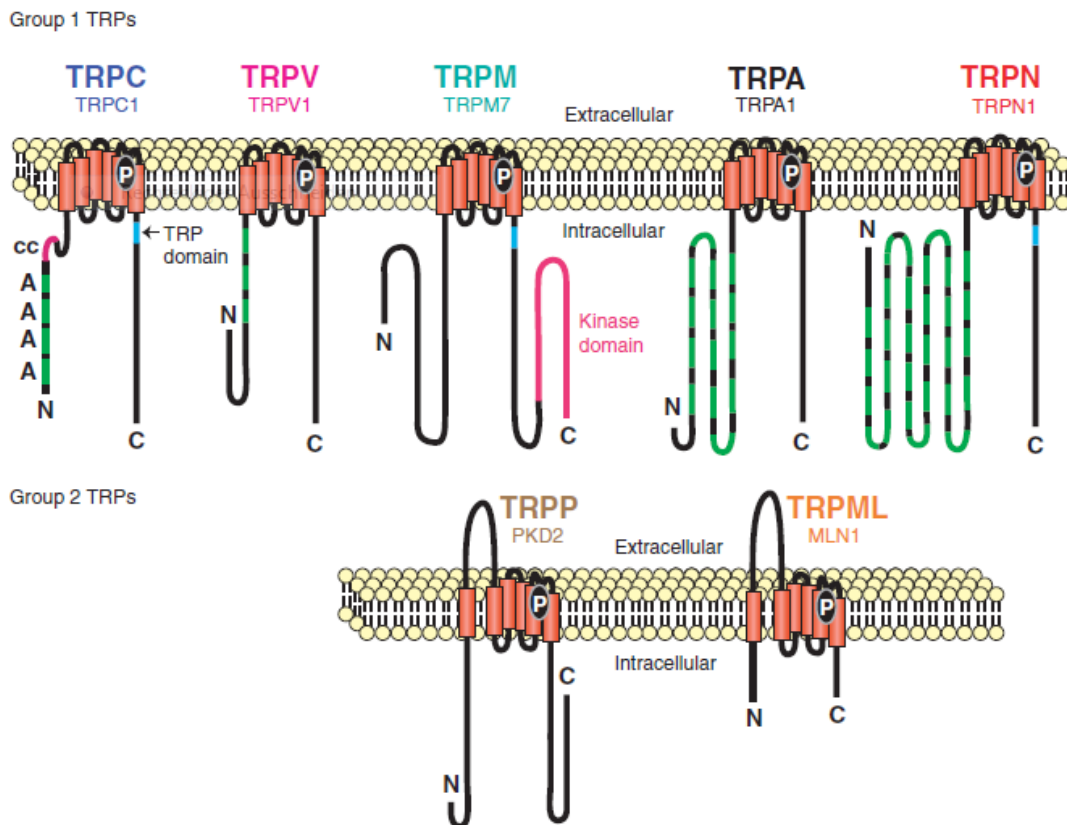
**Abb. 1:** Einteilung der TRP-Kanäle in ihre Subfamilien (Clapham, 2003)

Die TRP-Kanäle sind nicht spannungsabhängige (eventuell geringfügig spannungsabhängige) Kationenkanäle (Montell, 1, 2005), welche für Natrium, Calcium und Kalium permeabel sind. TRPC-, TRPM- und TRPN-Proteine besitzen eine TRP-Domäne, welche aus 23 – 25 Aminosäuren besteht und am C-terminalen Ende der sechsten Transmembrandomäne vorhanden ist (Montell, 1, 2005). Nur TRPM6 und 7 enthalten eine Proteinkinase, welche sich am C-terminalen Ende befindet (Montell, 1, 2005). Die 3 – 4 Ankyrin-Wiederholungen an den TRPC-

Proteinen sind Phospholipase C –abhängige, unselektive Kationenkanäle (Montell, 1, 2005), (Abb. 2).

TRP-Kanäle werden in Gehirnen von Säugetieren reichlich exprimiert und sind bei der sensorischen Signalübertragung bei Reizen wie Licht, Temperatur, Geruch, Geschmack und mechanischen Kräften aktiviert (Aarts und Tymianski, 2005; Montell, 1, 2005).

Zusätzlich zur physiologischen Rolle bei der sensorischen Signalübertragung führen Mutationen in TRP-Kanälen zu Hypomagnesiämie, polyzystischen Nierenerkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen (Nilius und Voets, 2013).



**Abb. 2:** Die sieben TRP-Subfamilien mit ihrem transmembranösen Aufbau und ihren Besonderheiten: Ankyrin Repeats (A), coiled coil domain (cc), Protein-Kinase (TRPM6/-7) (Montell, 1, 2005)

### **1.1.1. TRPC6**

TRPC6 ist ein nicht-selektiver Kationenkanal, dessen Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  sechsfach höher ist als für  $\text{Na}^+$  (Dietrich und Gudermann, 2014). Er gehört in die Familie der klassischen TRPC-Kanäle und bildet zusammen mit TRPC3 und -7 eine Diacylglycerol- (DAG-) sensitive Subfamilie (Montell, 1, 2005). Eine Aktivierung durch den second messenger DAG wurde in TRPC6 und -7 nachgewiesen (Hofmann et al., 1999). Eine weitere Regulation von TRPC6 erfolgt über Tyrosin-, Serinphosphorylierung oder über Phosphatidylinositol (Dietrich und Gudermann, 2014).

Eine besonders hohe TRPC6-Expression besteht im Cerebrum, in den Basalganglien und in der Lunge, geringere Konzentrationen sind in glatter Muskulatur und Niere zu finden (Kunert-Keil et al., 2006). Mehrere Studien weisen darauf hin, dass TRPC-Kanäle an neuronaler Stammzellproliferation und ZNS-Entwicklung beteiligt sind (Li et al., 1999; Pla et al., 2005; Sossey-Alaoui et al., 1999; Boisseau et al., 2009).

Eine erhöhte TRPC6-Konzentration in glatter Muskulatur findet sich bei pulmonaler arterieller Hypertonie (Yu et al., 2004; Inoue et al., 2006; Park et al., 2014). Durch Aktivierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle mit darauf folgender Membrandepolarisation und Natriumeinstrom durch TRPC6 Kanäle kommt es zur Muskelkontraktion in der glatten Muskulatur (Dietrich und Gudermann, 2014).

TRPC6 ist ein wichtiger Ionenkanal der Podozyten und damit essentiell für die Nierenfunktion (Dietrich und Gudermann, 2014).

Die TRP-Kanäle sind an der Tumorgenese verschiedener Gewebe beteiligt (Guilbert et al., 2008). TRPC6 wird ebenfalls in Prostatagewebe exprimiert (Yue et al., 2009). Es zeigte sich bei Gewebeuntersuchungen eine erhöhte Expression des Kanals in Prostatakarcinomen (Yue et al., 2009).

### **1.1.2. TRPM7**

Die TRPM-Kanäle zeigen eine wichtige Funktion im Bereich der Sensorik (Montell, 1, 2005). TRPM7 gehört in die Melastatin-TRPM-Unterfamilie der TRP-Kanäle und wird ubiquitär in verschiedenen Konzentrationen exprimiert (Montell et al., 2005). In C57BI-Mäusen zeigte sich die TRPM7-Expression in Niere, Gehirn, Skelettmuskulatur, Herz, Leber, Lunge, Milz und Geschlechtsorganen besonders hoch (Kunert-Keil et al., 2006).

TRPM6 und -7 sind „Chanzyme“, d.h. sie besitzen eine atypische, C-terminale Enzymdomäne von 347 Aminosäuren (Montell, 1, 2005). Diese Enzymdomäne ist zusätzlich und unabhängig von der TRPM Domäne vorhanden (Montell, 1, 2005). Diese Kinaseaktivität ermöglicht die Selbst- und die Substratphosphorylierung und ist somit notwendig für die Kanalfunktion. Eine weitere Aktivierungsmöglichkeit ist die Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -ATP (Montell, 1, 2005). Bei einer intrazellulären Konzentration von  $< 1$  mM Mg-ATP erfolgt eine Aktivierung des TRPM7-Kanals (Monteilh-Zoller et al, 2003). Dabei erfolgt die Bildung eines MagNuM (magnesium-nucleotide-regulated metall ion) (Nadler et al., 2001; Hermosura et al., 2002; Monteilh-Zoller et al., 2003). ATP verstärkt die Aktivität von TRPM7 durch die Produktion von Mg-ATP (Nadler et al., 2001; Venkatalacham und Montell, 2007). Die TRPM7-Aktivierung kann ebenfalls durch den pH-Wert, ATP, Lipide und Translokation ausgelöst werden (Venkatachalam und Montell, 2007). Eine Hochregulation von TRPM7 wird durch einen Abfall des extrazellulären pH-Wertes von 7,4 auf 4 verursacht (Jiang et al., 2005; Venkatachalam und Montell, 2007). Eine Herabregulation der TRPM7-Aktivität resultiert bei dem Verbrauch von ATP zur  $PIP_2$ -Generierung (Runnels et al., 2002; Venkatachalam und Montell, 2007).

TRPM7 ist selektiv permeabel für divalente Kationen wie  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  und somit auch für Spuren von Metallen wie  $Zn^{2+}$  und  $Ni^{2+}$ , wodurch Akkumulationsgefahr besteht (Monteilh-Zoller et al., 2003; Kunert-Keil et al., 2006). Die hohe Permeabilität für divalente Kationen wird durch eine geringe Calciumkonzentration verbessert,  $PIP_2$  reguliert ebenfalls die Durchlässigkeit der TRPM7-Kanäle (Aarts und Tymianski, 2005). Im Gegensatz dazu kann eine Kanalblockierung durch Gadolinium verursacht werden (Aarts und Tymianski, 2005).

Zusätzlich permeabel zeigt sich TRPM7 für  $Mn^{2+}$  und  $Co^{2+}$ , ebenso wie für die unphysiologischen oder toxischen Metallionen  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  (Monteilh-

Zoller et al., 2003). Hierdurch erscheint TRPM7 als ubiquitäre Einstrombahn für Metallionen, was weitreichende Folgen für physiologische und pathologische Prozesse hat (Monteilh-Zoller et al., 2003).

Auch spielt TRPM7 eine wichtige Rolle in der Tumorgenese: Der Kanal wurde in Mammakarzinomzellen überexprimiert nachgewiesen (Guilbert et al., 2008; Park et al., 2014). Die Rolle des Kanals bei der Tumorgenese besteht durch die Regulation der Calciumaufnahme und die nachfolgende Potenzierung der Zellproliferation (Guilbert et al., 2008). Zusätzlich zur Beteiligung an malignen Neoplasien durch veränderte Expression des Kanals besteht eine essentielle Rolle des TRPM7-Kanals in der Embryonalentwicklung und Organogenese (Yee et al., 2014).

Die fundamentale Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  in sämtlichen zellulären Prozessen wurde 1999 von Berridge et al. ausführlich belegt. Der TRPM7-Kanal steuert über  $\text{Mg}^{2+}$  die Entwicklungs- und Lebensfähigkeit der Zellen (Schmitz et al., 2003).

Aufgrund der TRPM7-Expression im vaskulären System besteht eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der Hypertonie (Yogi et al., 2011).

Neben der Magnesium-Homöostase steuert der TRPM7-Kanal die intrazelluläre Signaltransduktion und Zellfunktion (Yogi et al., 2011). Diese Aufgaben entstehen aus den beiden Funktionen als Ionenkanal und als Kinase (Yogi et al., 2011). Es wurden bisher drei Substrate der Kinase identifiziert: Annexin-1, Myosin IIA heavy chain und Calpain (Dorovkov et al., 2004; Clark et al., 2006; Su et al., 2006; Yogi et al., 2011). Aufgrund der Kinase-Aktivität ist TRPM7 in der glatten Gefäßmuskulatur an antiinflammatorischen Antworten, Zellwachstum, Zellmobilität und –kontraktilität sowie Apoptose beteiligt (Dorovkov et al., 2004; Clark et al., 2006; Yogi et al., 2011). Hierdurch wird im kardiovaskulären System der Blutdruck beeinflusst (Yogi et al., 2011).

Zusammen mit TRPM6 ist er wichtig für die  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Resorption in Darm und Niere (Lis et al., 2005; Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002; Voets et al., 2004). Bei TRPM6-Mutationen zeigen sich Defekte in der  $\text{Mg}^{2+}$ -Absorption im Darm und in der  $\text{Mg}^{2+}$ -Ausscheidung durch die Niere mit sekundärer Hypocalciämie (Voets et al., 2004). Er befindet sich u.a. in den Membranen von Acetylcholin-sezierenden synaptischen Vesikeln von sympathischen Neuronen. Hier sind sie wichtig für die Neurotransmitterausschüttung (Krapivinsky et al., 2006; Park et al., 2014).

Substrate der TRPM7-Kinase enthalten die schweren Ketten der Proteine Annexin A1 und Myosin IIA, welche eine Interaktion der Kinase-Domäne mit dem Kanal annehmen lassen (Dorovkov und Ryazanov, 2004; Clark et al., 2008; Paravicini et al., 2012). Änderungen der TRPM7-Expression und –Aktivität führen zu grundlegenden Veränderungen der Zellproliferation und –differenzierung (Paravicini et al., 2012). In Modellversuchen zeigte sich durch eine TRPM7 Ausschaltung eine Änderung des Zellwachstums und der embryonalen Entwicklung (Paravicini et al., 2012).

TRPM7-Kanäle vermitteln den durch Sauerstoffmangel hervorgerufenen neuronalen Zelltod und werden durch metabolischen Stress oder Veränderungen der extrazellulären Calciumkonzentration aktiviert (Aarts und Tymianski, 2005).

## **1.2. Vorkommen und Konzentrationen**

Kunert-Keil et al. zeigten 2006 mittels RT-PCR, dass die TRPM-Expression in sämtlichen Gewebearten der Maus höher war als die der TRPC- und TRPV-Familien. Hierbei war TRPM7 in der Mehrheit der getesteten Gewebe (M. tibialis anterior, M. gastrocnemius, Herz, Diaphragma und Niere) dominant exprimiert und zeigte sich lediglich im Cerebrum geringer exprimiert als TRPC3 und 6 (Kunert-Keil et al., 2006). Insbesondere in der Muskulatur zeigte sich TRPM7 als dominante Isoform mit der höchsten Expression in der glatten Gefäßmuskulatur der Aorta (Kunert-Keil et al., 2006). In den C57Bl-Zellen wurden in Nieren, Cerebrum, Skelettmuskulatur und Herz im Vergleich zu weiteren Mausstämmen die höchsten TRPM7-Konzentrationen gemessen (Kunert-Keil et al., 2006).

TRPC6 zeigte eine hohe Expression in den Hirnarealen Cerebrum, Basalganglien, Ventrikelependym und Purkinjefasern (Kunert-Keil et al., 2006). Die TRP-Kanäle ließen sich ebenfalls in peripheren Geweben nachweisen, wobei hier TRPC3 die dominante Isoform darstellte (Kunert-Keil et al., 2006).

Aufgrund der hohen Expression der Calcium-selektiven Kationenkanäle TRPC3 und TRPC6 im Herzmuskel kann vom Mitwirken an der kardialen Calciumhomöostase ausgegangen werden (Kunert-Keil et al., 2006).

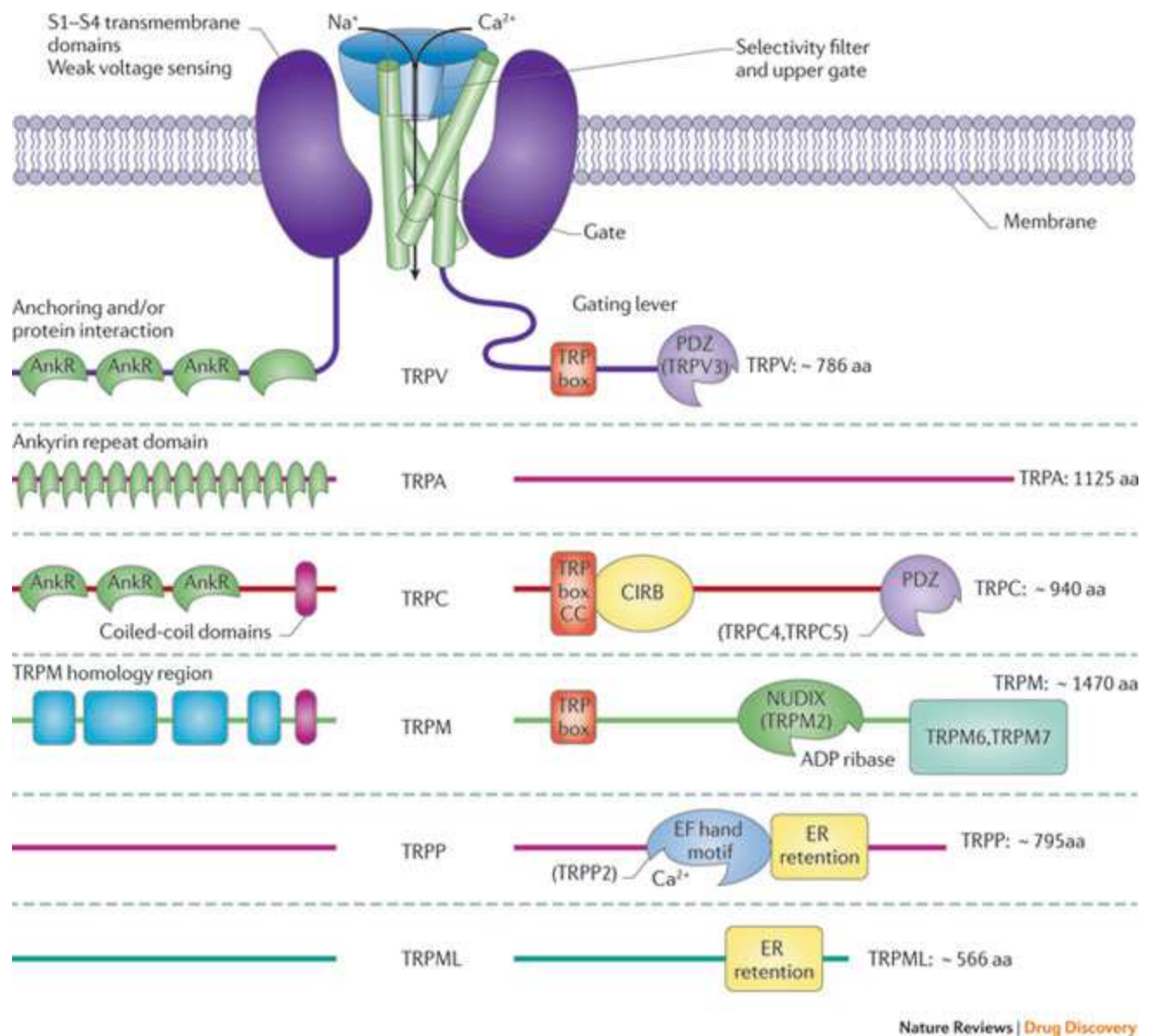
### **1.3. Genstruktur sowie biologische, chemische und physikalische Eigenschaften**

Drei TRPM-Proteine (TRPM2,-6,-7) sind Chanzyme mit zusätzlicher C-terminaler Enzymdomäne in Form einer  $\alpha$ -Kinase (Montell, 1, 2005; Kunert-Keil, 2006).

In Säugetieren wurden sieben TRPC-Proteine beschrieben, wobei in Menschen TRPC2 ein Pseudogen darstellt (Wes et al., 1995; Montell, 1, 2005). Anhand der primären Aminosäuresequenz erfolgt die Einteilung der TRPC-Proteine in vier Untergruppen (Montell, 1, 2005). Die TRPC-Proteine enthalten jeweils drei bis vier Ankyrin-Repeats, sechs Transmembrandomänen und 750 – 900 Aminosäuren am N-terminalen Ende, welche die TRP-Domäne enthalten (Montell, 1, 2005).

TRPC6 befindet sich zusammen mit TRPC3 und 7 in der Untergruppe 3 der TRPC-Proteine und besteht aus einer Aminosäuresequenz von 815 – 931 Aminosäuren (Montell, 1, 2005). TRPC6 ist auf Chromosom 11q21-q22 lokalisiert (Montell, 1, 2005).

TRPM7 ist spezifisch permeabel für divalente Kationen, insbesondere Magnesium und Calcium (Montell, 1, 2005). Die Kanalaktivierung erfolgt durch Phosphorylierung oder  $Mg^{2+}$ -ATP (Montell, 1, 2005). Die chromosomal Lokalisation für TRPM7 ist 15q21 (Montell, 1, 2005). Der menschliche TRPM7-Kanal umfasst 39 Exone und kodiert ein Protein mit 1863 Aminosäuren (Paravicini et al., 2012). Der Kanal besteht aus vier Untereinheiten, die an der Kanalpore mitwirken (Paravicini et al., 2012). Jede Untereinheit wird aus sechs Transmembrandomänen gebildet (Abb. 3), die zentrale Pore befindet sich zwischen der fünften und sechsten Domäne (Paravicini et al., 2012). Die Proteine von TRPM7 und TRPM6 haben zu 49% die identische Aminosäuresequenz (Paravicini et al., 2012).



**Abb. 3:** Spezifischer Aufbau der TRP-Kanäle am aminoterminalen und C- (carboxy) terminalen Ende: TRPV, TRPA und TRPC mit Ankyrin-Repeats (AnkR): TRPV, TRPM und TRPC mit TRP box für gating-Funktion; TRPP und TRPML mit Endoplasmatischem Retikulum (ER); Aminosäuren (aa); calmodulin/inositol-1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) receptor binding domain (CIRB); nucleoside diphosphate-linked moiety X (NUDIX); acronym for postsynaptic density protein 95 (PSD95) (PDZ); Drosophila disc large tumour suppressor (DLGA) and zonula occludens protein 1 (ZO1), (Moran et al., 2011)

#### **1.4. Zielstellung der Arbeit**

Skelettmuskeln sind für alle bewussten Bewegungen verantwortlich. Jede Skelettmuskelfaser ist ein Syncytium, welches sich durch Fusion vieler Myoblasten entwickelt. Das Protein TRPM7 konnte in differenzierten Muskelzellen nachgewiesen werden und stellt einen Calcium- und Magnesium-leitenden Kanal aus der Familie der „transient receptor potential“ (TRP) Familie von Ionenkanälen dar (Kunert-Keil et al., 2006). Es wird angenommen, dass TRPM7 zusammen mit TRPM6 eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der zellulären Magnesiumhomöostase hat (Yogi et al., 2011; Schmitz et al., 2003). So führt z.B. eine spontane Mutation im TRPM6-Gen zu Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie (Voets et al., 2004). TRPM6 und TRPM7 werden für die Aufnahme von Calcium und Magnesium im Darm und die Resorption in der Niere verantwortlich gemacht (Lis et al., 2005; Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002; Voets et al., 2004). Des Weiteren ist bekannt, dass TRPM7 wichtig ist für die Zellviabilität und eine Schlüsselrolle spielt beim durch Ischämie und Sauerstoffmangel hervorgerufenen neuronalen Zelltod (Asrar und Aarts, 2013). Das Überleben der Zellen ist abhängig von der adäquaten TRPM7-Expression. Schmitz et al. zeigten 2003, dass es bei TRPM7-Knockdown innerhalb von 24 h zum Zelltod und Wachstumsstillstand kam. Unter Zugabe von großen Mengen  $Mg^{2+}$  konnte ein Überleben der Zellen sichergestellt werden.

In der Arbeit von Krüger et al., 2008 wurde gezeigt, dass der Gehalt an SCN4A und RYR1 in MDX-Zellen signifikant auf 25 – 60 % reduziert war im Vergleich zu Kontrollmäusen. Diese zwei Differenzierungsmarker wurden nach TRPM7-Knockdown untersucht.

Daher stellte sich die Frage, welche Rolle hat TRPM7 bei der Muskeldifferenzierung und besteht eine Abhängigkeit der Differenzierung vom TRPM7-Kanal?

Des Weiteren war zu untersuchen, ob sich bei relevanter mRNA-Expression eine Korrelation oder Veränderung auf Proteinebene nachweisen lässt. Dafür wurden die Kanalproteine an fixierten Muskelzellen lokalisiert. Darüber hinaus wurde der Einfluss des TRPM7-Knockdowns auf die Differenzierung von Muskelzellen untersucht.

## **II. Material und Methoden**

### **2.1. Materialien**

Für die Versuchsdurchführung und Ermittlung der Ergebnisse wurden neben handelsüblichen Chemikalien (nicht im Einzelnen aufgeführt) folgende Materialien von den aufgeführten Herstellern verwendet. Die verwendeten Chemikalien sind mindestens in der Spezifikation „reinst“ oder im höchstmöglichen kommerziell zu erwerbenden Reinheitsgrad verwendet worden.

#### **2.1.1. Chemikalien**

Anti-TRPC6	Alomone labs, Israel
Anti-TRPM7	Alomone labs, Israel
AllStars Negative Control si-RNA (5nmol)	QIAGEN, Deutschland; Catalog no.: 1027280
AllStars Negative Control si-RNA 488 nm Alexa Fluor	QIAGEN, Deutschland
Assay on Demand TRPC6	Applied Biosystems, Deutschland
Assay on Demand TRPM7	Applied Biosystems, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Braun, Deutschland
Bicinchoninic Acid solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Blockingreagenz	Roche Biochemicals, Deutschland
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega, USA
ChemMate™ Target Retrieval Solution	Dako Cytomation Denmark, Dänemark
Coomassie®Brilliantblau G250	Carl Roth GmbH, Deutschland
Dako Cytomation Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation Denmark, Dänemark
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)	Promega, USA

GeneAmp® dNTP Mix with dTTP	Applied Biosystems, USA Product P/N N808-0260, Insert P/N 904983 REV C, L/N 0803197
Dimethylsulphoxide Hybri-Max®	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland
Dulbecco´s PBS (1x) without Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH, Österreich
FastStart Universal Probe Master (Rox)	Roche, Deutschland
HiPerFect Transfection Reagent	QIAGEN, Deutschland
Kaleidoscope™-Marker	BIORAD Precision Plus Protein™ Standards, 4307894 Rev B, Catalog #161-0375
Kupfer(II)-Sulfat Pentahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Ponceau S Solution	Sigma, USA
Roti-Blue Kolloidale Coomassie-Färbung	Carl Roth GmbH, Deutschland
Roti®-Load 1	Carl Roth GmbH, Deutschland
SDS ultra pure	Carl Roth GmbH, Deutschland
si-RNA Mm_TRPC6_5_HP	QIAGEN, Deutschland
si-RNA Mm_TRPC6_7_HP	QIAGEN, Deutschland
si-RNA Mm_TRPM7_5_HP	QIAGEN, Deutschland; Catalog no.: SI02674238, Gene Accession no.: NM_021450
si-RNA Mm_TRPM7_7_HP	QIAGEN, Deutschland; Catalog no.: SI02717750, Gene Accession no.: NM_021450
SYTOX®Green nucleic acid stain 488	Molecular Probes, Eugene USA, Leiden The Netherlands
TaqMan Ribosomal RNA Control Reagent	Applied Biosystems, Deutschland
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Deutschland (4304437, 4318157, 4326708)



TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Cat. No.: 4304437
Vectastain Goat Normal Serum ABC-Kit	Vector Laboratories, USA

### **2.1.5. Fotomaterialien**

Röntgenfilme	Agfa
Röntgenfilmentwickler T30	Calbe Fotochemie
Schnellfixierer	Agfa

### **2.1.6. Zellkulturmedien**

E`MEN	Gibco, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin
Skeletal Muscle Cell Growth Medium Low Serum (500 ml)	PromoCell® SupplementMix C-39365 25ml FCS 10,0 ng / ml EGF 1,0 ng / ml bFGF 0,5 mg / ml Fetuin 0,1 mg / ml Insulin 0,4 µg / ml Dexamethasone
Skeletal Muscle Cell Differentiation Medium Serum Free (500 ml)	PromoCell® SupplementMix C-39366 10,0 µg / ml Insulin

### **2.1.7. Verwendete Lösungen**

10 % APS	66 µg APS + 660 µl H <sub>2</sub> O
Coomassie-Färbung	60 ml H <sub>2</sub> O + 20 ml Methanol + 20 ml Roti-Blue

---

1x TBE	100 mM TRIS (tris-Hydroxymethylamino- methan) 86 mM Borsäure 2,5 mM EDTA pH 8,0
0,2 % Triton	0,02 g Triton / ml in A. dest.
0,02 % Tween	20 mg Tween 20 / ml in A.dest.
1 x TRIS/HCl-Puffer	40,65 mM TRIS Base 434,6 mM TRIS / HCl 1,5 M NaCl, pH 7,4
1 x PBS	137 mM NaCl 26,8 mM KCl 8,09 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
Blocking Reagenz	2,5 g Magermilch in 50 ml PBS
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg / ml H <sub>2</sub> O
Lysepuffer	50 mM Glycyl-glycin 5 mM Natriumacid NaN <sub>3</sub> pH 8,2
Trenngel 7,5 %	7,2 ml A.dest. 3,8 ml Trenngelpuffer 1,5 M TRIS, pH 8,8 3,8 ml 30 %ige Acrylamidlösung 75 µl 20 %iges SDS 150 µl 10 %iges APS 15 µl TEMED

Laufpuffer 10x SDS-Page-Puffer	1,92 M Glycin 0,25 M TRIS 1 % SDS
Lämmli-Puffer 10%	Serva, Deutschland
Blot-Puffer	135 ml (90ml) 10x Laufpuffer 150 ml (100ml) Methanol 1215 ml (1000 ml) A.dest.
Ponceau-S-Lösung	0,2 g Ponceau S 3 g Trichloressigsäure 100 ml A.dest.
10 x Saccharose-Stopper	0,2 M EDTA 25 %ige Saccharose 0,25 %iges Bromphenolblau

### **2.1.8. Primer und Sonden**

Für die Standard RT-PCR wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Primer verwendet. Die Primer wurden von TIBMOBBIOL oder MWG bezogen, Sequenz 5'-3'.

GAPDH	for	ACC	ACA	GTC	CAT	GCC	ATC	AC
	rev	TCC	ACC	ACC	CTG	TTG	CTG	TA

Fragmentlänge 451 bp

TRPC6	for	AAA	GAT	ATC	TTC	AAA	TTC	ATG	GTC
	rev	CAC	GTC	CGC	ATC	ATC	CTC	AAT	TTC

Fragmentlänge 326 bp, Accessionnumber: NM\_013838.1

mTRPC6 for AGT TCC TCG TGG TCC TT  
 rev CTT TAC ATT CAG CCC ATA

Fragmentlänge 317 bp, 48°C

TRPM7 for CGG AGC TGG TCG CAC AAT TA  
 rev CCT GGA AGA CAT CTG TGA GG

Fragmentlänge 295 bp, Accessionnumber: NM\_021450.1

### **2.1.9. Antikörper**

Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/AP	Dako Cytomation Denmark, Dänemark
anti-TRPC6	Alomone Labs, Jerusalem
anti-TRPM7	Unicus GmbH, Deutschland
anti-Rabbit IgG Alexa 568	Molecular Probes, USA

### **2.1.10. siRNAs**

Die verwendeten siRNAs wurden von der Firma QIAGEN hergestellt.

Mm\_Trpc6\_5\_HP siRNA, Spezies Maus

Target Sequence: CAG AAG ATT ATC ATT TAA ATA

Sense: r(GAA GAU UAU CAU UUA AAU A)dTdT Batch No.: 319999

Antisense: r(UAU UUA AAU GAU AAU CUU C)dTdG Batch No.: 320000

Accession number: NM\_013838

Mm\_Trpc6\_7\_HP siRNA, Spezies Maus

Target Sequence: TAC ATG TTT AAT GAT CAT TCA

Sense: r(CAU GUU UAA UGA UCA UUC A)dTdT Batch No.: 320001

Antisense: r(UGA AUG AUC AUU AAA CAU G)dTdA Batch No.: 320002

Accession number: NM\_013838

Mm\_Trpm7\_5\_HP siRNA, Spezies Maus

Target Sequence: AAG CTG TTA AAT AGT GTT TAA

Sense: r(GCU GUU AAA UAG UGU UUA A)dTdT Batch No.: 328678

Antisense: r(UUA AAC ACU AUU UAA CAG C)dTdT Batch No.: 328679

Accession number: NM\_021450

Mm\_Trpm7\_7\_HP siRNA, Spezies Maus

Target Sequence: AAG GCA ATT TCC AAT ATT GTA

Sense: r(GGC AAU UUC CAA UAU UGU A)dTdT Batch No.: 328680

Antisense: r(UAC AAU AUU GGA AAU UGC C)dTdT Batch No.: 328681

Accession number: NM\_021450

### **2.1.11. Geräte**

Digitalkamera, HVC 20 N	Hipachi, Japan
Elektrophoreseapparatur Protean II	Biorad
Horizontale Elektrophoresekammer Blue Marine 100/200	Serva Elektrophoresis GmbH
Eppendorf UVette®	Eppendorf AG, Hamburg
Inkubator 37°C	Johanna Otto GmbH, Deutschland
Kühlzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Deutschland
Mikrozentrifuge	Mikro 22R
Minicycler	Biorad
TaqMan PCR system 5700 Sequence Detektor	Applied Biosystems, Deutschland
Thermocycler Px2	Thermo Electron, Deutschland
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf
BioPhotometer	Eppendorf, Deutschland
Rotationsschüttler	VWR
UV-Leuchttisch TFL-20M	Biometra

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Vorbereitung der Zellkulturen / Zellernte**

Die Arbeit mit den Zellkulturen fand unter sterilen Bedingungen statt. Die einzelnen Differenzierungsphasen wurden mikroskopisch mit 100-facher Vergrößerung unter voller Belichtung nach 0, 3 und 6 Tagen fotografiert und dokumentiert.

Bei den Vorversuchen wurde für die TRPC6-exprimierenden HEK293-Zellen das Zellmedium E'MEN (+ 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) verwendet. Die adhärennten Zellen wurden in ihren Flaschen 2x mit 2,5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl Trypsin-EDTA abgelöst und mit zusätzlich 2,5 ml Medium aufgenommen. Die Suspensionen wurden bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert und erneut mit Medium aufgenommen. Jeweils 20 µl der Zellsuspension wurden für die Zellzählung auf eine Mikrotiterplatte gegeben, mit 20 µl Trypanblau die avitalen Zellen angefärbt und in einer Thoma-Zählkammer bei 10-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellsuspensionen wurden erneut bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert und 1 Mio. Zellen in 100 µl Zellsuspension zur Weiterverarbeitung mit 5 µl Zellmedium versetzt. Kurz vor der Transfektion wurden 160000 Zellen (laut Fast Forward Protokoll 0,4 – 1,6 x 10<sup>5</sup> Zellen) pro Well (24-Well-Platte) in jeweils 0,5 ml geeignetes Nährmedium (mit Serum und Antibiotika) gegeben und bis zur siRNA-Transfektion bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (siehe Transfektion unter 2.2.9).

Die anschließenden Versuche erfolgten mit transfizierten C57BI-Zellen. Diese erhielten für 48 h das Proliferationsmedium (Promocell1), danach fand ein Wechsel auf Differenzierungsmedium (*Skeletal Muscle Cell Differentiation Medium* = Promocell2, + 1% PIS, + 1,6 µl γ-Interferon auf 100 ml Medium) statt. Von der Zellsuspension wurden 500, 800 und 1000 µl / Well verwendet und bei 33 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach jeweils 2 Tagen fand ein Mediumwechsel statt. Danach wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturschale gelöst und in 600 µl 1xPBS aufgenommen.

### **2.2.2. RNA- und Protein- Isolation**

Die Isolation erfolgte nach dem AllPrep RNA-/Protein-Protokoll. APL-Puffer und RLT-Puffer wurden bei RT (15 – 25 °C) aufbewahrt,  $\beta$ -Mercaptoethanol wurde dem RLT-Puffer hinzugefügt (10  $\mu$ l  $\beta$ -ME / 1 ml RLT-Puffer) und der RPE-Puffer wurde mit 100 %igen Ethanol verdünnt.

Zunächst wurde die *Protein Cleanup spin column* durch Vortexen vorbereitet, um anschließend mit geöffnetem Boden in 2 ml *collection tubes* umgesetzt und für 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert zu werden. Anschließend wurden 500  $\mu$ l Äquilibrierungs-Puffer (Gly-Gly-Puffer, pH 8,2) auf die *Cleanup-Säule* gegeben, alles gevortext, bei 3000 rpm zentrifugiert und in ein neues Gefäß verbracht. Zu den mit PBS gewaschenen Zellen wurde der APL-Puffer hinzugegeben (200  $\mu$ l APL-Puffer bei einer 12 well-plate), für 5 min inkubiert und danach durch auf- und abpipettieren vermischt. Das Lysat wurde in eine *AllPrep spin column* überführt und 1 min bei  $\geq$  10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss kam in die *Protein Cleanup spin column* und nach 3 min zentrifugieren bei 1700 rpm war das Endprodukt isoliertes Protein, welches auf Eis verbracht wurde. Die *AllPrep spin column* kam in ein neues Gefäß mit Zugabe von 350  $\mu$ l RLT-Puffer (mit  $\beta$ -ME). Das  $\beta$ -ME besaß reduzierende Wirkung und fungierte so als RNase-Inhibitor. Nach dem Zentrifugieren der Proben für 1 min  $\geq$  10000 rpm erfolgte die Zugabe von 350  $\mu$ l 70 %iges EtOH zum Durchfluss und diese Probe wurde auf die *RNeasy spin column* gegeben und 1 min bei  $\geq$  10000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 700  $\mu$ l RW1-Puffer auf die *RNeasy spin column* gegeben und 30 sec  $\geq$  10000 rpm zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Durchflusses, erfolgte 2x die Zugabe von 500  $\mu$ l RPE-Puffer (mit 100 % EtOH) auf die *RNeasy spin column* und die Zentrifugation von 30 sec bei  $\geq$  10000 rpm. Der restliche Waschpuffer ließ sich durch zentrifugieren mit höchster Umdrehungszahl für 1 min aus der *RNeasy spin column* entfernen. Diese wurden in neue Gefäße gesetzt, 2x 30  $\mu$ l RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert und jeweils 1 min bei  $\geq$  10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt reine RNA.

### Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA:

Die Konzentrationsbestimmung basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm, für dieses sind die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Die Bestimmung des RNA-Gehaltes und der Reinheit gelang durch Messen einer RNA-Verdünnung im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. in einer Küvette gegen einen Nullwert (Aqua dest.). Die Konzentration war das Produkt aus Extinktion, Verdünnung und OD (optische Dichte), wobei bei RNA 1 OD 50 µg/µl entsprach. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80 °C.

### 2.2.3. Umschreibung der RNA in cDNA

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) aus dem in *E. coli* exprimierten Murine Leukemia Virus (MuLV) (Krüger et al., 2008) erfolgte die Umschreibung von 200 ng RNA in cDNA. Zuerst wurde ein RNA-DNA-Hybridstrang aus einzelsträngiger RNA synthetisiert. Der RNA-Strang wurde durch die RNase-Aktivität der Polymerase abgebaut und es entstand mit der synthetisierten cDNA eine doppelsträngige DNA (dsDNA). Diese diente dem indirekten mRNA-Nachweis. Für die Umschreibung der RNA in eine cDNA wurden Random-Hexamere benutzt, die sequenzspezifisch binden konnten (Krüger et al., 2008). Zunächst wurde die einzusetzende RNA- und Wassermenge in µl anhand der photometrisch bestimmten Konzentration ng/µl berechnet, so dass 9,6 µl Gesamtmenge aus Wasser und RNA entstanden. Anschließend wurde der Mastermix (25 µl Ansatz) nach folgendem Pipettierschema angesetzt: 2,5 µl 10x – Puffer, 5,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5,0 µl 10 mM dNTP's, 0,5 µl RNase-Inhibitor, 1,25 µl Random-Hexamere, 0,68 µl Reverse Transkriptase. Die ermittelte Wassermenge wurde in sterile Eppendorfgefäße vorgelegt, 15,4 µl Mastermix hinzu pipettiert und die entsprechende RNA-Menge hinzugefügt. Im Thermocycler Px2 wurde das Programm A:03 RT-PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Phase 1 bestand aus 4 Schritten, im ersten wurden die Ansätze für 10 min auf 25 °C erwärmt, im zweiten für 30 min auf 48 °C gehalten, im dritten Schritt 5 min auf 95 °C erhitzt und im vierten auf 4 °C heruntergekühlt und gehalten für 9 h. In Phase 2 wurde die Temperatur weiterhin auf 4 °C gehalten. Die Aufbewahrung der synthetisierten cDNA erfolgte bei 4 °C.

#### **2.2.4. PCR (Polymerase-Kettenreaktion)**

Die synthetisierte cDNA wurde hierbei verwendet, um in einer PCR spezifische Sequenzen zu amplifizieren (Krüger et al., 2008). Die Synthese komplementärer DNA-Stränge wurde durch die DNA-Polymerase und 2 Primer eingeleitet. Die Primer entsprachen dem 5'- bzw. 3'-terminalen Ende des zu amplifizierenden DNA-Segmentes (Krüger et al., 2008). In den Zyklen wurde die Doppelstrang-DNA durch Hitzedenaturierung zertrennt, so dass sich die spezifischen Primer anlagern konnten (Krüger et al., 2008). Die Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* diente als DNA-Polymerase, welche die komplementären DNA-Stränge exponentiell synthetisiert (Krüger et al., 2008).

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes mit einem Gesamtvolumen von 25 µl bestand aus 2,5 µl 10x Puffer, 1,0 µl 10 mM dNTP's, 1,0 µl Forward-Primer (50 pmol/µl), 1,0 µl Reverse-Primer (150 pmol/µl), 0,3 µl Polymerase und 17,2 µl H<sub>2</sub>O. Den jeweils erhaltenen 23,0 µl wurden 2 µl cDNA hinzugefügt und die Negativkontrolle erfolgte mit reinstem Wasser. Die Ansätze wurden im Thermocycler Px2 für 5 min bei 94 °C denaturiert (Krüger et al., 2008). Danach folgten 40 Zyklen, bei denen sich die Primer für 15 s bei 54 °C spezifisch anlagerten, die Synthese der DNA-Stränge für 30 s bei 72 °C und die Denaturierung des Doppelstranges für 15 s bei 94 °C (Krüger et al., 2008). Anschließend erfolgte eine 5-minütige Elongation bei 72 °C und das Herunterkühlen auf 4 °C (Krüger et al., 2008). Für die Identifikation der entstandenen PCR-Produkte diente die Agarosegelelektrophorese (Krüger et al., 2008). Dazu wurden 100 ml 1x TBE zusammen mit 3 g Agarose erhitzt und vor dem Auftragen mit 6 µl Ethidiumbromid / 100 ml TBE-Agarose-Gemisch versetzt. Die PCR-Produkte wurden mit 1/10 Volumen 10x Saccharosestopper versetzt und zusammen mit einem Marker (100 bp Ladder equal) auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 mA für 30 min und anschließend wurden die aufgetrennten Fragmente durch den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht, fotografisch festgehalten und digitalisiert (Krüger et al., 2008).

### **2.2.5. Real-time quantitative PCR nach dem Taqman-Prinzip**

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren. Die Quantifizierung der DNA erfolgt durch eine Fluoreszenzmessung während der PCR-Zyklen. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die eigentliche Messgröße, der  $C_T$ -Wert, gibt an, ab welchem PCR-Zyklus ein Signal oberhalb des Schwellenwertes (threshold) erreicht wird. Dabei ergibt sich ein linearer Zusammenhang, wenn man die  $C_T$ -Werte halblogarithmisch gegen die Ausgangskopienzahl der Zielsequenz vor der Amplifikation aufträgt. Am Ende eines Laufes wurde anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen, da nur zu diesem Zeitpunkt optimale Reaktionsbedingungen herrschten und die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz anstieg. Das Referenzgen 18S rRNA wurde als interner Standard mit gemessen, um einen relativen Mengen-Vergleich durchzuführen. Die Quantifizierung erfolgte durch Eichkurven mit externen Standards.

Die RT-PCR ähnelte der normalen PCR. Der Unterschied bestand darin, dass der Reaktion ein drittes markiertes Oligonukleotid zugefügt wurde, welches als TaqMan-Sonde fungierte und zu der zu detektierenden DNA-Sequenz komplementär war (Krüger et al., 2008). Hierdurch erfolgte eine Hybridisierung der Sonde mit der DNA zwischen den beiden Primern (Krüger et al., 2008). Dabei wurde die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase genutzt um das dritte Oligonukleotid abzubauen und eine Detektion zu ermöglichen. Wenn die Taq-Polymerase die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaute, entfernten sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz konnte gemessen werden. Die Detektion basierte auf Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer: Der Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) wurde mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und strahlt die aufgenommene Energie als Licht einer anderen Wellenlänge wieder ab (Krüger et al., 2008). Das Anregungs- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes war charakteristisch (Krüger et al., 2008). Brachte man ein weiteres Fluorochrom mit demselben Anregungs- und Emissionsspektrum in ausreichende Nähe zum ersten, wurde die abgestrahlte Energie vom ersten direkt zum zweiten Fluorochrom übertragen und von diesem als Licht einer spezifischen Wellenlänge abgestrahlt (Krüger et al., 2008). Es konnte die abgestrahlte Energie des ersten oder des zweiten Fluorochroms verfolgt werden. Bei

der ersten Variante stellte das erste Fluorochrom den Reporter und das zweite Fluorochrom den Quencher dar (Krüger et al., 2008). Das TaqMan-Prinzip basierte auf der Fluoreszenzdetektion mit dem PCR-Gerät. Hierbei saßen Reporter und Quencher auf demselben dritten Oligonukleotid am 5'- und 3'- Ende, wobei die Lichtaussendung des Reporters gering war (Krüger et al., 2008). Sobald das Oligonukleotid durch die Polymerase abgebaut wurde stieg die Lichtemission mit fortschreitenden Abbau stetig an (Krüger et al., 2008). Mit dem TaqMan PCR System 5700 Sequence Detektor fand ein direkter Nachweis statt, da die Fluoreszenzintensität mit der Quantität der mRNA korrelierte. Die genspezifischen Sonden waren am 5'- Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM: 6-carboxy-fluorescein) und am 3'- Ende mit einem Quencher (TAMRA: 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) versetzt (Krüger et al., 2008).

Der Mastermix wurde für die entsprechende Probenanzahl nach folgendem Pipettierschema / Probe angesetzt: 10 µl 2x UMM, 6 µl H<sub>2</sub>O und 2 µl 10x Sondenmix. Der Sondenmix für 300 Proben setzte sich wie folgt zusammen: 75 µl Ribosomal revers Primer, 75 µl Ribosomal forward Primer, 75 µl Ribosomale probe und 375 µl H<sub>2</sub>O. Für die Doppelbestimmung wurden 39,6 µl Mastermix und 4,4 µl cDNA gevortext. Aus diesem Gemisch wurden jeweils 20 µl pro Well auf die Mikrotiterplatte aufgebracht. Die Eichkurve beinhalteten die Verdünnungsstufen 10<sup>6</sup> bis 10<sup>2</sup> und eine Leerprobe mit H<sub>2</sub>O. Die Mikrotiterplatte wurde mit Folie beklebt und vor der Analyse durch das TaqMan PCR System bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Proben wurden in Stufe 1 zunächst für 2 min auf 50 °C erwärmt innerhalb eines Zyklus. Stufe 2 beinhaltete ebenso 1 Zyklus, bei dem die Proben für 10 min auf 95 °C erwärmt wurden. In der 3. Stufe durchliefen die Proben 40 Zyklen, bei denen sie jeweils 15 s auf 95 °C erhitzt wurden. Zuletzt verweilten die Proben bei 60 °C für 1 min (Krüger et al., 2008). Die laserinduzierten Fluoreszenzsignale wurden detektiert und die entstandenen DNA-Kopien anhand der Standardmessreihe ermittelt (Krüger et al., 2008). So wurde anhand des negativen linearen Anstiegs des Fluoreszenzsignals zum Logarithmus der Kopienzahl dem Signal eine bisher unbekannte Kopienzahl zugeordnet. Die mRNA-Quantität in Form von Kopienzahl wurde ins Verhältnis gesetzt mit der ermittelten Kopienzahl der 18S rRNA derselben cDNA und der Quotient mit 1000 multipliziert. Die Daten wurden nach einer Standardkurvenanpassung als Mittelwert (x) ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Für die Bestimmung der Signifikanzen wurde der ungepaarte Student's

t-Test mittels Sigma Plot-Programm durchgeführt. Die statistisch signifikanten Unterschiede wurden wie folgt gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,005$ .

### **2.2.6. Immunhistochemie**

Das Ziel der *in-situ* Darstellung der Proteine war der Nachweis der Lokalisation von TRPC6 und TRPM7 und deren Ausschaltung durch die Transfektion. Es erfolgte die Darstellung der Bindung des Primärantikörpers an die gesuchten Antigene. Nach der Fixierung des histologischen Gewebes erfolgte die Applikation eines unmarkierten Primärantikörpers. Dieser stammte von einem Kaninchen und erkannte spezifisch das gesuchte Epitop (indirekte Immunfluoreszenz, Krüger et al., 2008). Nach der Inkubation wurden die überschüssigen ungebundenen Antikörper abgewaschen und es erfolgte eine Inkubation mit einem Sekundärantikörper, welcher gegen die Immunglobuline der Zielzellen gerichtet war und an den Primärantikörper band (Krüger et al., 2008). Der Sekundärantikörper war mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, welcher unter mikroskopischer Betrachtung durch Anregung von Laser eine spezifische Wellenlänge abstrahlte und dadurch die Detektion der Proteine ermöglichte (Krüger et al., 2008).

Die Fixierung der HEK293- und C57BI-Muskelzellen erfolgte in mehreren Schritten: Zuerst wurden die Zellen zweimal in 800  $\mu\text{l}$  1x PBS, gewaschen und danach 20 min in 150  $\mu\text{l}$  4 % PFA in PBS auf Eis fixiert. Das 4%ige PFA setzte sich aus 2 g PFA und 50 ml PBS zusammen. Diese Bestandteile wurden auf die Heizplatte verbracht und unter Rühren für 30 min bei +80 °C erwärmt, bis eine klare Flüssigkeit entstand. Nach dem Abkühlen des Gemisches erfolgte die pH-Einstellung auf 7,4 mittels des pH-Meters durch Zugabe von Natronlauge oder HCl. Nach zweimaligen Waschen in 1x PBS wurden die Zellen 20 min mit 0,2 % Triton in PBS (150  $\mu\text{l}$ ) auf Eis permeabilisiert und danach erneut zweimal in 1x PBS gewaschen. Das 20-minütige Blocking erfolgte mit Ziegen Serum (Vectastain ABC-Kit, alkalische Phosphatase, drei Tropfen auf 10 ml 1x PBS) und diente der Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper durch Absättigung mit Proteinen. Anschließend folgte 2x Waschen in 1x PBS und 3x Waschen in Tris/HCl. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-TRPC6 verdünnt 1:100 und 1:200, bzw. Anti-TRPM7 1:200 in ChemMate™) bei 10 °C über Nacht zur Markierung des gesuchten Antigens und die

Negativkontrolle mit ChemMate™. Der 2. Tag begann mit dreimaligem Waschen in Tris/HCl + 0,02 % Tween und anschließender Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Alexa 568 anti-Rabbit 1:500 in Tris/HCl angesetzt) für 2 – 3 h abgedeckt bei RT. Im Anschluss wurde der nicht gebundene Anteil des Sekundär-AK durch 3x Waschen mit Tris/HCl + Tween bei RT und 2x Waschen mit Tris/HCl entfernt. Nun erfolgte die Anfärbung der Kerne mit Sytox®Green (100 µl 0,1 µM 1:50000 in DMSO) für 10 min bei RT. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagerte sich in die Doppelhelix der DNA ein und konnte später unter Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm als grüne Fluoreszenz in den Kernen nachgewiesen werden (Krüger et al., 2008). An die Färbung anschließend wurden die Zellen zweimal 5 min mit Tris/HCl gewaschen und die Objektträger mit *Dako Cytomation Fluorescent Mounting Medium* und Deckgläschen versehen. Mit einem konfokalen Lasermikroskop (Nikon) und 63-fachem Immersionsobjektiv wurden die Zellen fotografiert und digitalisiert.

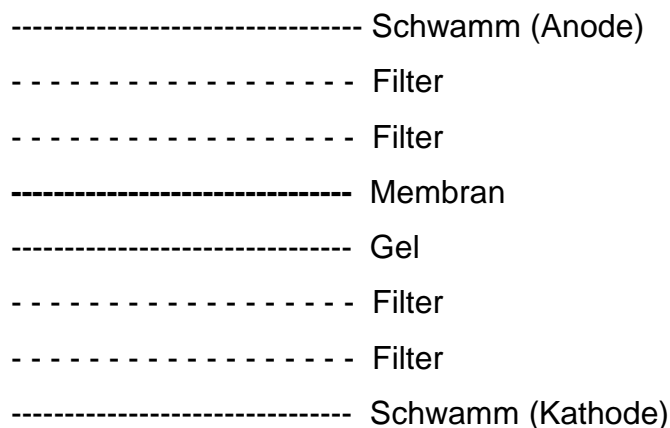
### **2.2.7. Proteinisolierung und -bestimmung / BCA-Assay**

Die Proteinisolierung erfolgte aus den Zellpellets, zu denen 250 µl Lyse-Puffer und 5 µl Protease-Inhibitor hinzugefügt und anschließend das Gemisch bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Danach wurde eine Eichreihe mit aufsteigendem BSA-Anteil (1 mg/ml) pipettiert: 0 µl BSA + 50 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl BSA + 40 µl H<sub>2</sub>O, 20 µl BSA + 30 µl H<sub>2</sub>O, 30 µl BSA + 20 µl H<sub>2</sub>O, 40 µl BSA + 10 µl H<sub>2</sub>O und 50 µl BSA + 0 µl H<sub>2</sub>O. Jeweils 10 µl dieser Eichwerte werden pro Well in Doppelbelegung auftragen. Die unverdünnten Proteine und der Leerwert wurden ebenfalls mit 10 µl pro Well aufgetragen. Die Färbereaktion erfolgte mit frisch angesetztem 4%igem CuSO<sub>4</sub> und BCA im Verhältnis 1:50, wovon jeweils 200 µl Reagenz pro Well dazugegeben und die Platte für 30 min bei 37 °C abgedeckt inkubiert wurde. Die Methode beruht auf der Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup>. BCA bildet spezifisch mit Cu<sup>+</sup> einen Farbkomplex, der sich kolorimetrisch im RotiQuan nachweisen lässt. Die Proteinmenge konnte anhand einer Eichkurve gemessen werden. Smith et al. veröffentlichten 1985 diesen BCA-Assay als Detektionssystem für Proteine, welches eine Kombination aus dem Biuret-Assay mit Bicinchoninsäure.

### **2.2.8. Western Blot**

Der Nachweis eines spezifischen Proteins erfolgt nach elektrophoretischer Auftrennung auf einer Trägermembran. Dazu wurden am 1. Tag 7,5 %ige Trenngelle gegossen und 1 h polymerisiert. Dann erfolgte die Fällung der Proteine mit Aceton: Jeweils 10 µg isolierte Proteine wurden mit 4 Volumenanteilen eisgekühltem Aceton versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 15000 rpm in der vorgekühlten Mikrozentrifuge (Mikro22R) bei + 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets luftgetrocknet. Die Pellets wurden mit 15 µl Gly-Gly-Puffer, pH 8,2 resuspendiert und mit 5 µl Rotiload durch Vortexen vermischt. Die Proben wurden zentrifugiert und für 10 min auf eine 70 °C warme Heizplatte gestellt, anschließend auf Eis gekühlt und zusammen mit dem Kaleidoscope™-Marker auf das 7,5 %ige Trenngel aufgetragen. Das Polyacrylgel befand sich in 10 %igem Laemmli-Puffer (50 ml Puffer + 450 ml Aqua dest.) mit senkrecht angelegtem elektrischen Feld von 30 mA für 1 h je Kammer. In dieser Trägermatrix erfolgte die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe.

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf Membranen geblottet, der Blotaufbau ist in Abbildung Nr. 4 dargestellt:



**Abb. 4:** Schematischer Aufbau eines Nassblots. Die Proteinauftrennung erfolgt von der Kathode in Richtung der Anode.

Der Aufbau wurde in Blotpuffer verbracht, welcher aus 90 ml 10x Laufpuffer ohne SDS, 810 ml H<sub>2</sub>O und 100 ml Methanol bestand. Das Blotten erfolgte über Nacht bei 4 °C, 50 V und 30 mA. Durch das senkrecht zum Gel angelegte elektrische Feld wurden die Banden eluiert und auf die Membran transferiert. Mit fortschreitender

Transferzeit trennten sich SDS und Proteine. Das verwendete Methanol verringerte die Wechselwirkungen zwischen Protein- und SDS-Molekülen und begünstigte diese zwischen Protein und hydrophober Membranoberfläche.

Am 2. Tag wurden die Membranen durch Waschen in A. dest. vom an die Proteine angelagertem SDS befreit und 3 h zur Fixierung getrocknet. Die folgenden Färbe- und Entfärbeschritte fanden zur besseren Verteilung auf der Membran auf dem Schüttler statt. Die Membranen wurden mit A. dest. angefeuchtet und die Gesamtheit der membrangebundenen Proteine wurde durch 5 min PonceauS-Färbung unspezifisch markiert und sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Membranen in A. dest. geschwenkt und durch das Einscannen der Färbung erfolgte die Detektion der Membranbeladung. Danach wurden die Membranen mit 1x PBS für 15 min entfärbt, anschließend kurz in A. dest. geschwenkt und 2 min in Enhancer-Lösung 1 (Pierce-Kit) inkubiert. Nach 5x Waschen mit A. dest. erfolgte die 10 minütige Inkubation mit Enhancer-Lösung 2 (Pierce-Kit) und danach erneut 5x Waschen mit A. dest. Jetzt wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran mit 5 % Magermilch in 1x PBS für 2 – 3 h bei RT geblockt. Die Membran wurde nun mit einer verdünnten Lösung des 1. AKs (Anti-TRPC6 1:200 in 5 %iger Magermilch / 1x PBS über Nacht bei 4 °C) behandelt.

Am 3. Tag wurden durch 3x 5 min Waschen mit 1x PBS/0,05% Tween unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran entfernt. Anschließend wurde eine Sekundär-Antikörper-Lösung (Anti-Rabbit-IgG-HRP 1:5000 in 5 %iger Magermilch / 1x PBS) für 2 – 3 h bei RT auf die Membran gegeben, deren Antikörper spezifisch gegen den Fc-Bereich der ersten Antikörper gerichtet waren und an diese banden. Es folgten weitere Waschschrte (2x 5 min 1x PBS / 0,05 % Tween, danach 10 min 1x PBS) und zuletzt erfolgte die Inkubation für 5 min im Dunkeln mit 3 ml ECL-Plus Substrat (Pierce-Kit, 1:40 Lsg. B:A, B=Luminogen) und anschließend die Sichtbarmachung durch Filmentwicklung in der Dunkelkammer. Die quantitative Beurteilung erfolgte mittels „GelScan“-Programm.

Um verschiedene Proteine zu detektieren bestand die Möglichkeit, die Membran zu stripfen: Dafür wurde sie kurz in PBS gewaschen, danach 15 – 30 min in Stripp-Lösung bei 37 °C verbracht und 2x für jeweils 7 min in PBS gewaschen. Die Blocking Drymilk (2,5 g Drymilk + 50 ml PBS) wurde für 30 min auf die Membran gegeben und anschließend erfolgte die Inkubation mit anti- $\alpha$ -Aktinin, clone AT6/172 (1:1000 in Drymilk verdünnt), bei RT für 1 – 2 h. Es folgten 3 Waschschrte je 5 min mit 1x

PBS/0,05%Tween. Als 2. AK wurde ein Anti-Mouse-IgG (HRP) 1:5000 in PBS-Tween + Drymilk für 1 – 2 h bei RT zur Membran gegeben. Es folgten als weitere Waschschriffe 2x 5 min in 1x PBS/0,05% Tween und anschließend 10 min in 1x PBS. Die Sichtbarmachung der Banden erfolgte mit 3 ml ECL-Plus-Substrat im Dunkeln für 5 min, dann wurde die Lösung abgegossen und die Membran mit einem Röntgenfilm in der Dunkelkammer versehen und dieser entsprechend der Anleitung entwickelt.

### **2.2.9. siRNA-Transfektion**

Das Ziel der Transfektion und des dadurch herbeigeführten Gen-Knockdowns war das Erlangen von Hinweisen auf die physiologische Bedeutung des betreffenden Gens. Diese Methode ermöglichte das Herunterregulieren der Expression von spezifischen Zielgenen in Mauszelllinien. Hierfür wurde der *RNAi Human/Mouse Starter Kit* verwendet. Das hierbei verwendete *HiPerFect Transfection Reagent* bestand aus einer Mischung kationischer und neutraler Lipide und ermöglichte eine hoch effiziente siRNA-Transfektion und einen Gen-Knockdown bei geringen Konzentrationen von siRNA. Hierdurch wurden die Nebeneffekte der siRNA in den isolierten Zielzellen minimiert. Das HiPerFect garantierte einen geringen Level an Zytotoxizität, sodass die Zellen nach der Transfektion wohlbehalten und funktionsfähig blieben.

Die hoch valide Negativkontrolle erfolgte mit 37,5 ng (5 nM) *AllStars Negative Control siRNA*, welche keine bekannten Knockdown- oder Silencing-Effekte auf die verwendeten Zellen hatte. Die nicht vorhandenen Homologien der siRNA mit mRNAs aus Säugetierzellen wurden durch Verwendung von Affymetrix® GeneChip®-Reihen bestätigt. Durch Klonierungsexperimente wurde das Eindringen der Negativkontroll-siRNA in den RNA-induced silencing complex (RISC) nachgewiesen. Der RISC schaltete die Produktion spezifischer Proteine aus oder verringerte diese (Gen Knockdown), indem er mRNA abbaute. Die spezifische siRNA stellte den antisense-Strang der Ziel-mRNA dar. Die siRNA band an die korrespondierende mRNA, welche daraufhin durch Aktivierung des Argonaut-Proteins, das als Ribonuklease wirkte, abgebaut wurde. Dadurch wurde die verfügbare mRNA und das entsprechende Protein verringert, da dieses nicht mehr durch Translation produziert werden konnte. Der RNA-Protein-Komplex funktionierte als Enzym und baute die dazugehörigen mRNAs ab.

Bei den Vorversuchen wurde die *Negative Control siRNA* mit Alexa Fluor 488 Fluorophore-Markierung verwendet und die Transfektionseffizienz mikroskopisch detektiert und dokumentiert. Hiermit konnte die optimale siRNA-Konzentration für die Folgeversuche ermittelt werden.

Es wurden für adhärenente Zellen in 24-Well Platten zwei verschiedene Protokolle für die Transfektion verwendet: Zum einen das „Traditionelle Protokoll“, bei dem die Zellen 24 h vor der Transfektion ausgesät wurden und zum anderen das „Fast-Forward Protokoll“, bei dem Aussaat und Transfektion am selben Tag stattfanden.

Die Transfektion fand unter sterilen Bedingungen an einem RNase-freien Arbeitsplatz statt. Zunächst wurden 250 µl siRNA Suspensionspuffer (im Kit) zu jeder Probe (5 nmol gefriergetrocknete siRNA) hinzugegeben, um eine 20 µM Lösung (20 µM siRNA entsprechen 0,25 µg/µl) zu erhalten. Nun erfolgte das Erhitzen der Proben für 1 min auf 90 °C und anschließend die Inkubation bei 37 °C für 60 min (diese Inkubationsschritte wurden nur beim ersten Gebrauch der siRNA durchgeführt). Die 20 µM Stock Solution (SL) wurde nach Gebrauch bei –20 °C aufbewahrt. Zum Gebrauch der Stock Solution wurden 10 µl der 20 µM SL zum einen mit 100 µl Suspensionspuffer zu einer 2 µM SL und zum anderen mit 1000 µl Suspensionspuffer zu einer 0,2 µM SL verdünnt.

Die verschiedenen siRNA-Konzentrationen setzten sich wie folgt zusammen: 1 nM (7,5 ng siRNA, 3 µl 0,2 µM SL auf 100 µl Medium ohne FCS + 3 µl HiPerFect-Reagenz), 5 nM (37,5 ng siRNA, 1,5 µl 2,0 µM SL auf 100 µl Medium ohne FCS + 3 µl HiPerFect-Reagenz) und 10 nM (75 ng siRNA, 3 µl 2,0 µM SL auf 100 µl Medium ohne FCS + 3 µl HiPerFect-Reagenz).

Im folgenden Abschnitt werden die Unterschiede der beiden verwendeten Protokolle dargelegt.

### **Fast-Forward Protokoll**

Kurz vor der Transfektion wurden 160000 Zellen (laut Protokoll  $0,4 - 1,6 \times 10^5$  Zellen) pro Well (24-Well-Platte) in jeweils 0,5 ml geeignetes Nährmedium (mit Serum u. Antibiotika) gegeben und bis zur Transfektion bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zugabe von 37,5 ng siRNA gelöst in 100 µl Kulturmedium ohne Serum führte zur Endkonzentration der siRNA von 5 nM. 3 µl *HiPerFect Transfection Reagent*® wurden zur siRNA gegeben und durch vortexen vermischt. Die Proben inkubierten für 5-10 min bei Raumtemperatur (15-25 °C) damit sich die Transfektionskomplexe

bilden konnten. Die Komplexe wurden tropfenweise auf die Zellen gegeben und vorsichtig vermischt. Die transfizierten Zellen inkubierten bei 37 °C (HEK293) bzw. 33 °C (C57Bl/10ScSn) und 5% CO<sub>2</sub>. Zum Abernten wurden die Zellen mit 1000 µl PBS gewaschen, zentrifugiert und nach abpipettieren des Überstandes bei -80 °C aufbewahrt.

### **Traditionelles Protokoll**

Vor der Transfektion wurden 10000, 50000 und 80000 Zellen (laut Protokoll 2 – 8 x 10<sup>4</sup> Zellen) pro Well (24-Well-Platte) in jeweils 0,5 ml geeignetes Nährmedium (mit Serum u. Antibiotika) gegeben und bis zur Transfektion 24 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Tag der Transfektion wurden die Ansätze durch vortexen vermischt und anschließend für 5-10 min bei Raumtemperatur (15-25 °C) inkubiert, damit sich die Transfektionskomplexe bilden konnten. Die Komplexe wurden tropfenweise auf die Zellen gegeben und vorsichtig vermischt. Die Transfektion fand bei jeder Zellzahl mit allen siRNA-Konzentrationen statt.

### **Bestimmung der Zellvitalität nach Transfektion**

Der *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* wurde zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in Zellkulturen verwendet. Er beruht auf der Quantifizierung des in metabolisch aktiven Zellen vorhandenen ATPs und kann daher für Proliferationsuntersuchungen eingesetzt werden. Grundlage des Assays war die Lyse der Zellen und die Bildung eines Lumineszenzsignals, das proportional dem ATP-Gehalt und der Zellzahl war. Dieses Signal resultierte aus den Eigenschaften einer thermostabilen Luciferasereaktion, die eine Halbwertszeit von etwa 5 h hatte.

Für die Durchführung wird eine lichtundurchlässige 96 Well-Platte verwendet, in welche 100 µl Zellsuspension pro Well pipettiert und 30 min äquilibriert wurden. Anschließend wurden 100 µl CellTiter-Glo® Reagenz (angesetzt nach Herstellerangaben) pro Well hinzugefügt und die Platte auf einen Schüttler für 2 min verbracht, um die Lyse der Zellen zu induzieren. Vor der Messung wurde die Platte 10 min bei RT inkubiert, um anschließend ein stabiles Lumineszenz-Signal zu erhalten. Die Messung dauerte 0,25 – 1 s in einem Luminometer.

## **III. Ergebnisse**

### **3.1. Etablierung der siRNA-Transfektions-Methode:**

#### **3.1.1. Transfektion mit fluoreszierender Alexa-RNA**

Die Ermittlung der benötigten siRNA-Konzentration erfolgte nach dem traditionellen Protokoll mit Zellzahlen von 10000, 50000 und 80000 HEK293-Zellen und Messzeitpunkten von 4, 6, 8 und 24 h. Hierbei wurde fluoreszierende Kontroll-siRNA in folgenden Konzentrationen verwendet: 1 nM, 5 nM und 10 nM. Zu den Messzeitpunkten erfolgte jeweils eine Fluoreszenzmessung.

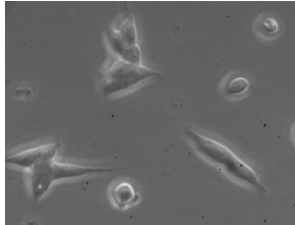
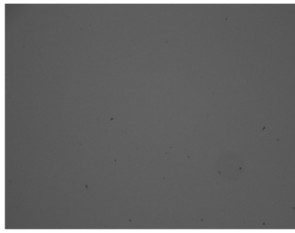
Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- 1.) Eine zu kurze Inkubationszeit (4 h) sowie eine zu niedrige siRNA-Konzentration (1 nM) führten zu keiner nachweisbaren siRNA-Transfektion (fehlen der Fluoreszenz).
- 2.) Bei dem traditionellen Protokoll mit 50000 - 80000 Zellen pro Well und 5 nM siRNA konnte durch die Fluoreszenz nach 24 h eine erfolgreiche Transfektion nachgewiesen werden.
- 3.) Bei Einsatz von zu hohen siRNA-Konzentrationen (10 nM) kam es zum Absterben der Zellen.

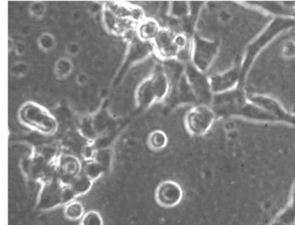
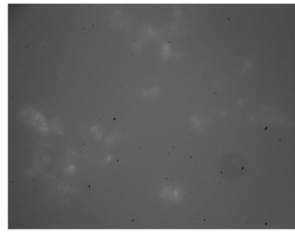
Zur Beurteilung der Zellviabilität nach Transfektion wurde ATP (Adenosintriphosphat) verwendet. Dieser Parameter ist in vitalen Zellen nachweisbar. Es zeigte sich die erfolgreichste Transfektion mit akzeptablem ATP-Gehalt unter Verwendung von 5 nM siRNA auf 50000 Zellen über einen Zeitraum von 24 h nach dem traditionellen Protokoll. Anhand dieser Fluoreszenzmessung konnte eine siRNA Transfektion nachgewiesen werden (Abb. 5).

Die weitere Etablierung der Methode erfolgte mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen, Zeitverläufen und unterschiedlichen Zellzahlen nach zwei Protokollen (Traditionelles Protokoll und Fast Forward Protokoll).

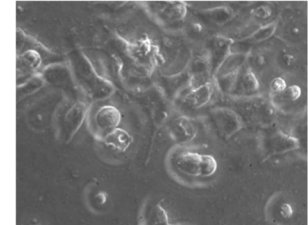
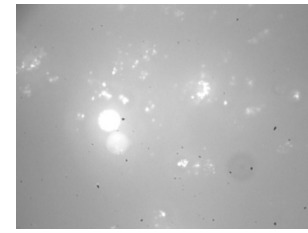
4 h 1 nM siRNA



24 h 5 nM siRNA



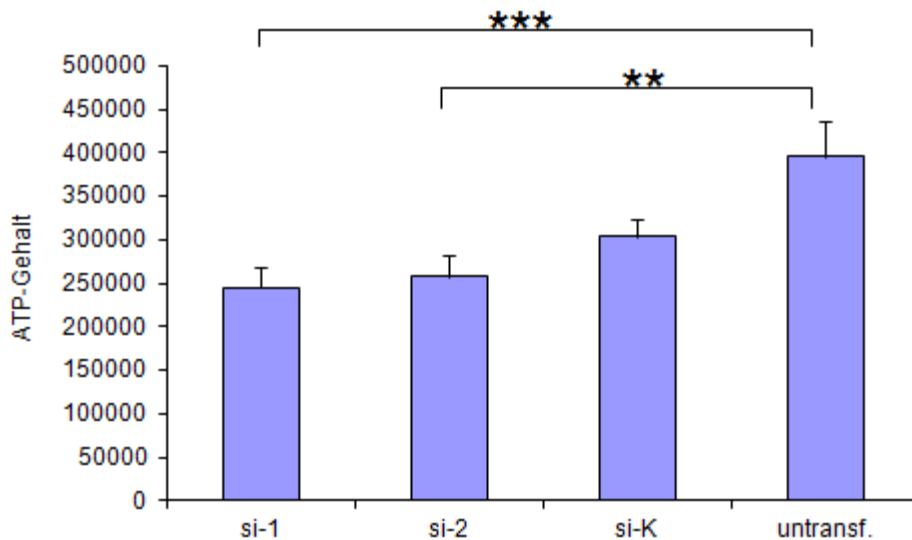
24 h mit 10 nM siRNA



**Abb. 5:** In der oberen Zeile befinden sich die Fluoreszenzbilder. Die untere Zeile zeigt den dazugehörigen Phasenkontrast. Es wurden jeweils 50000 Zellen behandelt. Bei der Fluoreszenzmessung liegt die Anregungswellenlänge bei 396 – 475 nm und Emission bei 20 – 50 nm größere Wellenlänge als die Anregungswellen, das Emissionsmaximum liegt bei 508 nm.

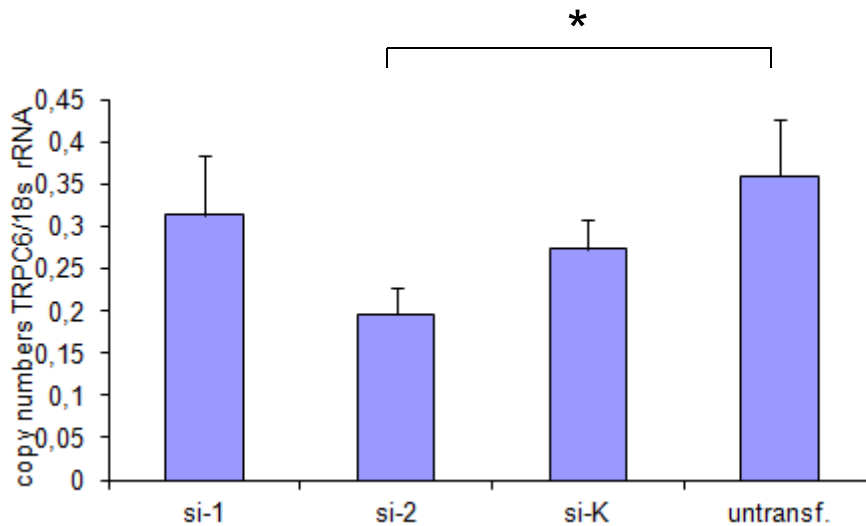
### **3.1.2. Nachweis des TRPC6-Knockdowns**

Zur weiteren Etablierung der siRNA-Transfektion wurden als nächstes TRPC6 überexprimierende HEK293-Zellen verwendet. Zwei verschiedene siRNAs (si-1 und si-2) gegen TRPC6 und eine Kontroll-siRNA, jeweils 5 nM, kamen bei der Transfektion zum Einsatz. Da diese siRNAs keinen Fluoreszenzmarker tragen, wurde der Erfolg der Transfektion mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und die Vitalität der Zellen durch Nachweis des ATP-Gehaltes bestimmt. Unter siRNA-1 zeigte sich nach 24 h ein hoch signifikanter ATP-Abfall (\*\*\*)  $p=0,00248$ ) und bei siRNA-2 ein sehr signifikanter ATP-Abfall (\*\*  $p=0,006099$ ) im Vergleich zu den untransfizierten Zellen. Die mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen zeigten eine nicht signifikante ATP-Abnahme im Vergleich zu den untransfizierten Zellen, jedoch einen höheren ATP-Gehalt als die siRNA-1 und -2 transfizierten Zellen (Abb. 6).



**Abb. 6:** ATP-Gehalt (in nM) der transfizierten Zellen. Das Säulendiagramm enthält  $n=24-40$  Einzelergebnisse aus 3-5 unabhängigen Transfektionen. Zur Veranschaulichung der Transfektionsauswirkungen (nach Fast Forward Protokoll) ist hier der ATP-Gehalt nach 24 h dargestellt. Die Säulen zeigen siRNA transfizierte Zellen im Vergleich zu untransfizierten HEK293-Zellen, dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\tau$ ),  $**p<0,01$ ;  $***p<0,005$  nach dem Student's T-test.

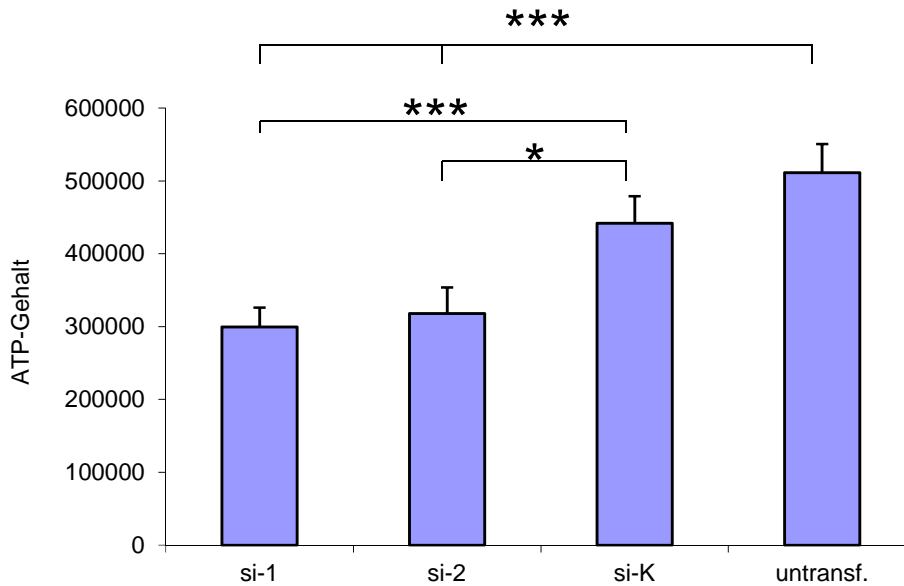
Zur Erfolgskontrolle des Transfektionsergebnisses wurde nach der ATP-Messung eine Quantifizierung des TRPC6-Kanals in den transfizierten und untransfizierten Zellen durchgeführt. Nach 24 h konnte mittels TaqMan eine signifikante Abnahme von TRPC6 durch siRNA-2 ( $* p= 0,0298$ ) verglichen mit den untransfizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 7). Mit der siRNA-1 konnte diesbezüglich kein signifikanter „Knockdown“ erreicht werden.



**Abb. 7:** Quantifizierung der TRPC6 mRNA in den siRNA-transfizierten HEK293-Zellen. Das Säulendiagramm enthält n=9-15 Einzelergebnisse aus 4 unabhängigen Transfektionen. Zur Veranschaulichung ist die Transfektionsauswirkung (nach Fast Forward Protokoll) anhand des Quotienten von TRPC6 zum Housekeeping-Gen 18s rRNA dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte nach 24 h für die siRNAs gegen TRPC6 und im Vergleich zu untransfizierten HEK293-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\tau$ ), \*  $p < 0,05$  nach Student's T-test.

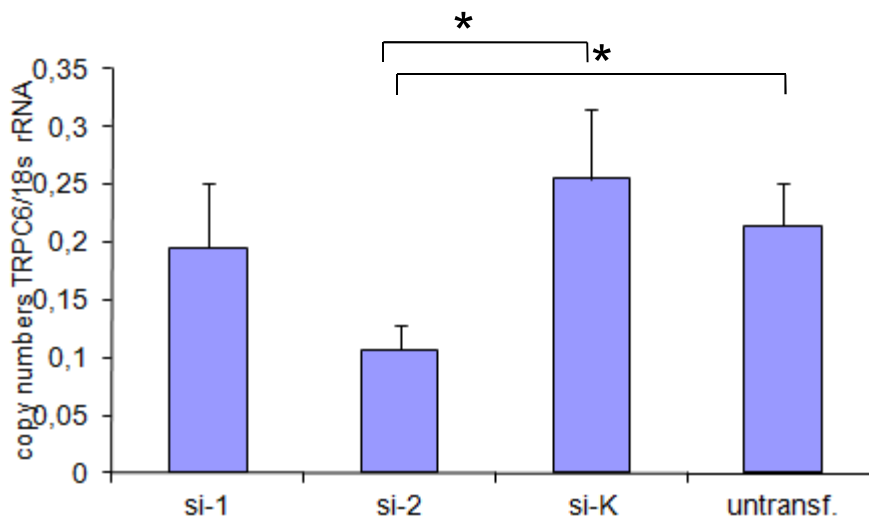
Eine ATP- und TRPC6-mRNA-Messung wurde nun nach 48 h durchgeführt (Fast Forward Protokoll). Es zeigte sich ein hoch signifikanter ATP-Abfall bei den siRNA-1 (\*\* $p = 0,00001917$ ) und siRNA-2 (\*\* $p = 0,0007294$ ) transfizierten Zellen verglichen mit den untransfizierten Zellen. Bezüglich der Kontroll-siRNA (si-K) zeigte die siRNA-1 einen hoch signifikanten (\*\* $p = 0,002296$ ) und die siRNA-2 einen signifikanten (\*  $p = 0,021887$ ) ATP-Abfall.

Die Zellvitalität der HEK293-Zellen war somit nachweislich 48 h nach Transfektion deutlich limitiert (Abb. 8). Die untransfizierten Zellen zeigten keinen ATP-Abfall nach 48 h.



**Abb.8:** ATP-Gehalt (in nM) von HEK293 nach Transfektion mit siRNA. Das Säulendiagramm enthält n=32-48 Einzelergebnisse aus 4-6 unabhängigen Transfektionen. Zur Veranschaulichung der Transfektionsauswirkungen (nach Fast Forward Protokoll) anhand des ATP-Gehaltes nach 48 h für die verschiedenen siRNAs gegen TRPC6 und im Vergleich zu untransfizierten HEK293-Zellen, dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  nach Student's T-test.

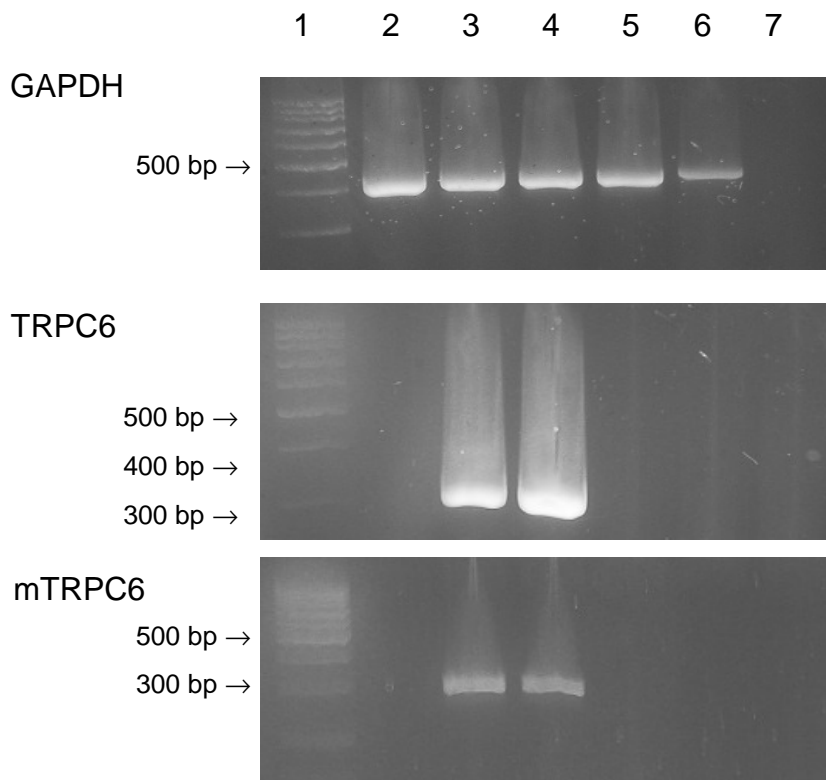
Die Darstellung in Abb. 9 zeigt, dass die TRPC6-Quantität nach 48 h weiter reduziert werden konnte. In Bezug auf die untransfizierten Zellen zeigten die siRNA-2 transfizierten Zellen eine signifikante Reduktion (\*  $p = 0,0217$ ), ebenso signifikant waren sie bezüglich den Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (\*  $p = 0,0280$ ).



**Abb. 9:** Quantifizierung der TRPC6-mRNA in siRNA-transfizierten Zellen. Das Säulendiagramm enthält  $n=12-14$  Einzelergebnisse aus 4 unabhängigen Transfektionen. Zur Veranschaulichung der Transfektionsauswirkungen (Fast Forward Protokoll) anhand des Quotienten von TRPC6 zum Housekeeping-Gen 18s rRNA nach 48 h für die siRNAs gegen TRPC6 und im Vergleich zu untransfizierten HEK293-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p < 0,05$  nach Student's T-test.

### **3.1.2.1. Nachweis von TRPC6 in HEK293-Zellen mittels RT-PCR**

Zum Nachweis der TRPC6 Genexpression wurde total-RNA aus TRPC6-exprimierenden HEK-Zellen isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Kapitel II, Abschnitt 2.2.4). Die Kontrolle wurde mit HEK293-Zellen durchgeführt. Zur Amplifikation wurden zwei verschiedene Primer verwendet: TRPC6 und mTRPC6. Der Vergleich erfolgte mit dem Housekeeping-Gen GAPDH und dem Leerwert  $H_2O$ . GAPDH wurde in beiden Zellarten exprimiert. Wie erwartet fand sich TRPC6 nicht in HEK293-Zellen, dafür aber in den TRPC6-exprimierenden HEK-Zellen (Abb. 10). Dies konnte mit beiden Primern nachgewiesen werden. GAPDH als Kontrolle befand sich in allen Proben außer im Leerwert. Die amplifizierten Fragmente hatten folgende Größen: GAPDH 451 bp, TRPC6 326 bp und mTRPC6 317 bp.



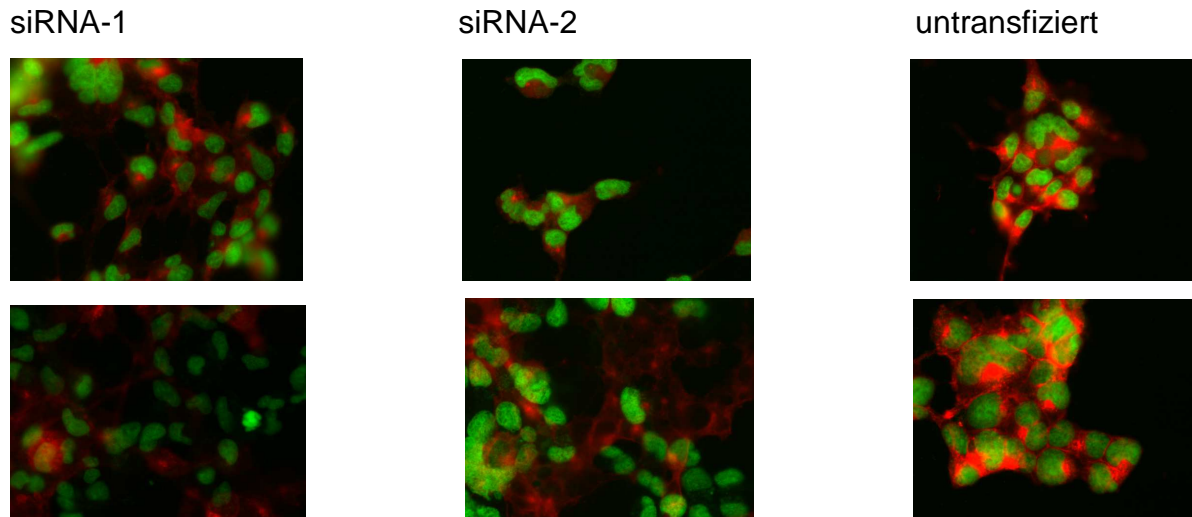
**Abb. 10:** RT-PCR mit cDNA, Agarosegele mit Ethidiumbromid, 10  $\mu$ l PCR-Produkt aufgetragen

Bahn 1: 100 bp DNA-Ladder, Bahn 2, 5, 6: HEK293-Zellen, Bahn 3, 4: TRPC6-exprimierende HEK-Zellen, Bahn 7: H<sub>2</sub>O als Leerwert

### **3.1.2.2. Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6-Knockdowns in-situ**

Zum weiteren Nachweis des TRPC6-Knockdowns wurden die TRPC6-überexprimierenden HEK293-Zellen zunächst nach dem Fast-Forward Protokoll mit 37,5 ng siRNA transfiziert. Im Anschluss wurden diese mit dem Primär-Antikörper anti-TRPC6 (Verdünnung 1:100 und 1:200), anschließend mit dem Sekundär-Antikörper anti-rabbit IgG (Verdünnung 1:500) und einer Gegenfärbung mit Sytox-Green (Verdünnung 1:50000 in DMSO) behandelt. In der dargestellten Immunhistochemie zeigte sich nach 48 h siRNA-Transfektion die Ausschaltung von TRPC6 in der Membran. Die Sytox-Green behandelten Zellkerne stellten sich grün dar, die rote Färbung anti-rabbit IgG zeigte die TRPC6-exprimierenden Zellen, welche bei den untransfizierten Zellen eine hohe TRPC6-Expression aufwiesen. Die transfizierten Zellen hatten demgegenüber eine deutlich geringere Expression an TRPC6-Kanälen. Die zwei verwendeten siRNAs siRNA-1 (anti TRPC6\_5) und

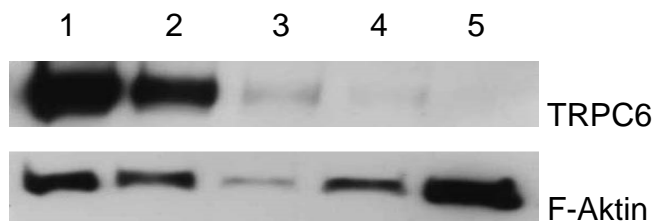
siRNA-2 (anti TRPC6\_7) zeigten keine nennenswerten Differenzen. Im zeitlichen Verlauf erfolgte eine Zunahme der unterdrückten Expression (Abb. 11, Verdünnung 1:200).



**Abb. 11:** Immunhistochemischer Nachweis. Konfokale Lasermikroskopie siRNA-transfizierter HEK-TRPC6-Zellen. Grün (Alexa 488), TRPC6-Anfärbung rot (Alexa 568) nach bereits 8 h erfolgreicher TRPC6-Knockdown.

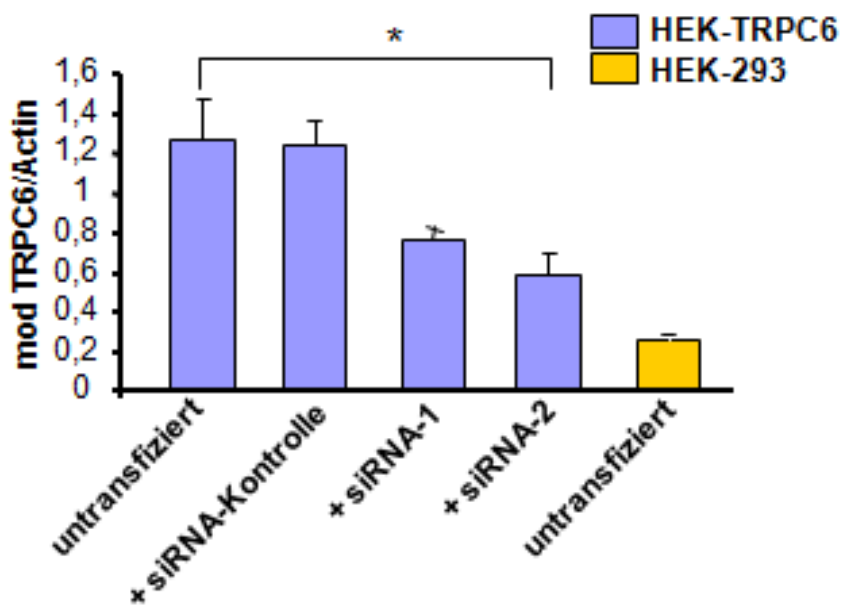
### **3.1.2.3. Nachweis von TRPC6-Knockdown mittels Western Blot**

Die Quantifizierung des Western Blots gelang mit Hilfe des Programmes GelScan 51, wie in Abb. 12 zu erkennen. Hierbei konnte auf Proteinebene eine signifikante TRPC6-Reduktion durch beide siRNAs nachgewiesen werden. Die Abbildung 12 zeigt die TRPC6-Expression im Vergleich zum Housekeeping-Gen F-Aktin. Man erkennt die hohe Expression von TRPC6 bei nicht siRNA-transfizierten Zellen im Vergleich zu der signifikant erniedrigten TRPC6-Konzentration nach siRNA-Transfektion. F-Aktin ist in allen Banden nachweisbar. Zur Überprüfung der Zelltoxizität von HiPerFect wurde eine zusätzliche Kontrollgruppe hinzugefügt. Hier zeigte sich jedoch eine mit den untransfizierten Zellen vergleichbare TRPC6- und F-Aktin-Quantität.



**Abb. 12:** Nachweis von TRPC6 in siRNA-transfizierten Zellen mittels Western Blot, Spalte 1: untransfizierte HEK-TRPC6 Zellen, Spalte 2: HEK-TRPC6 Zellen + HiPerFect, Spalte 3: HEK-TRPC6 Zellen + siRNA-1, Spalte 4: HEK-TRPC6 Zellen + siRNA-2, Spalte 5: untransfizierte HEK-293 Zellen

Mit Hilfe des TRPC6/Actin-Quotienten konnte bezogen auf das Housekeeping-Gen Aktin eine deutliche TRPC6-Reduktion durch die siRNAs erzielt werden, insbesondere durch siRNA-1 (Abb.13). HEK-293 Zellen welche den TRPC6 nicht exprimierten waren in dem Test wie erwartet negativ.



**Abb. 13:** TRPC6-Quantifizierung auf Proteinebene. Der TRPC6-Gehalt der Zellen wurde mit dem Aktin-Gehalt verglichen. Die Daten basieren auf Western Blot Experimenten wie in Abb. 12 dargestellt.

Als Resümee der Protokoll-Etablierung konnten folgende Erkenntnisse für die weitere Versuchsreihe verwendet werden: Das Fast-Forward Protokoll wurde mit

einer Aussaat von 100000 Zellen und einer siRNA-Konzentration von 5 nM fortgeführt. Die hohe Zellzahl wurde aufgrund des immer wieder nachweisbaren ATP-Abfalls unter siRNA-Transfektion gewählt. Das Ziel war das Überleben von ausreichenden Zellzahlen zur Überprüfung der Proliferation und Differenzierung nach Transfektion. Die Messzeitpunkte wurden auf 24h und 48h festgelegt. Das Traditionelle Protokoll wurde mit 50000 Zellen / Well fortgeführt. Hierbei sollte der Transfektionserfolg anhand von verschiedenen Konzentrationen und Transfektionszeiten bei C57BI-Zellen erneut ermittelt werden.

## **3.2. Einfluss von TRPM7 auf die Muskeldifferenzierung**

### **3.2.1. ATP-Gehalt nach TRPM7-Knockdown durch siRNA**

Zur Ermittlung der optimalen siRNA-Konzentration (möglichst großer TRPM7-Knockdown bei vitalen oder gering beeinträchtigten C57BI-Zellen) wurde das Traditionelle Protokoll verwendet. Im Anschluss sollte mit der dann festgelegten siRNA-Konzentration die optimale Transfektionszeit für die weitere Arbeit mit den C57BI-Zellen ermittelt werden.

#### **3.2.1.1. Konzentrationsabhängigkeit**

Unter Verwendung des Traditionellen Protokolls wurden verschiedene siRNA-Konzentrationen (5, 10, 25 und 50 nM) zum Zeitpunkt 48 h auf ihre Vitalität untersucht. Die Vitalität der Zellen konnte jeweils nach 48 h für jede Konzentration ermittelt werden und galt als wegweisender Parameter für die weiter zu verwendende siRNA-Konzentration.

Die ATP-Konzentration nach siRNA-1 Transfektion zeigte keine Abhängigkeit des ATP-Gehaltes der C57BI-Zellen von der jeweiligen siRNA-Konzentration. Verglichen mit untransfizierten und HiPerFect-behandelten Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede und somit keine relevante Auswirkung der Transfektion auf die Zellvitalität.

Die Transfektion von C57BI-Zellen mit siRNA-2 gegen TRPM7 zeigten einen Einbruch des ATP-Gehaltes bei den untransfizierten Zellen im Vergleich zu den

vitalen transfizierten Zellen: Die untransfizierten Zellen zeigten in diesem Fall eine signifikant niedrigere ATP-Konzentration bezogen auf 10 nM siRNA-2 (\*  $p=0,0386$ ), sowie einen hoch signifikant niedrigeren ATP-Gehalt bezogen auf 25 nM siRNA-2 (\*\* $p=0,000334$ ) und 50 nM siRNA-2 (\*\* $p=0,0000654$ ). Es zeigten sich bei den untransfizierten, mit HiPerFect-behandelten Zellen hoch signifikant niedrigere ATP-Level als bei 10 nM siRNA-2 (\*\* $p=0,002455$ ), 25 nM siRNA-2 (\*\* $p=0,000008598$ ) und 50 nM siRNA-2 (\*\* $p=0,00000193$ ).

Zum Vergleich fand eine Transfektion mit einer Kontroll-siRNA statt, welche ebenfalls einen konzentrationsunabhängigen ATP-Einbruch zeigte. Es zeigte bei den untransfizierten Zellen im Vergleich mit 10 nM si-K (\*\* $p=0,00034$ ), 25 nM si-K (\*\* $p=0,0000261$ ) und 50 nM si-K (\*\* $p=0,00006313$ ) jeweils ein hoch signifikant niedrigerer ATP-Gehalt bei den Untransfizierten. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei den untransfizierten HiPerFect-behandelten Zellen verglichen mit der Kontroll-siRNA: 10 nM (\*\* $p=0,0000027$ ), 25 nM (\*\* $p=0,000000432$ ) und 50 nM (\*\* $p=0,000001171$ ).

In der folgenden Tabelle 1 ist eine Übersicht der ATP-Ergebnisse zusammengefasst, die ausführlichen Diagramme finden sich im Anhang.

	siRNA-1	siRNA-2	siRNA-K
<b>5nM</b>	67517±9038	127259±19670	89414±13523
<b>10nM</b>	127895±15118	252073±43887*###	327907±38892**###
<b>25nM</b>	92495±2574	370400±49891**	420914±50737
<b>50nM</b>	81408±3150	434020±59006	405752±52022
<b>u+HiP</b>	97890±18541	97890±18541	97890±18541
<b>untransf.</b>	136999±28535	136999±28535	136999±28535

**Tab. 1:** ATP-Gehalt (in nM) nach 48 h Transfektionszeit aus 4 Transfektionen mit  $n=16-30$  Einzelergebnissen, Traditionelles Protokoll. Die Bezeichnung „u+HiP“ steht für untransfizierte, mit *HiPerFect Transfection Reagent®* behandelte C57Bl-Zellen; „untransf.“ steht für unbehandelte C57Bl-Zellen; siRNA-K entspricht der Kontroll-siRNA. Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SF). \* bedeutet signifikant gegenüber untransfizierten Zellen; # bedeutet signifikant gegenüber u+HiP (\*/#  $p<0,05$ ; \*\*/###  $p<0,01$ ; \*\*\*/###  $p<0,005$  nach Student's T-test).

### **3.2.1.2. Zeitabhängigkeit**

Unter Verwendung von 5 nM siRNA gegen TRPM7 wurde der zeitliche Verlauf von 24 bis 96 h untersucht. Die niedrige siRNA-Konzentration von 5 nM wurde gewählt, um die Zellen über einen längeren Zeitraum beobachten zu können unter Vermeidung toxischer Konzentrationen. Hierfür wurde zum besseren Vergleich erneut das Traditionelle Protokoll verwendet (Tab. 2). Nach 24 h stellte sich bezogen auf die Transfektion mit Kontroll-siRNA ein hoch signifikanter Einbruch der ATP-Konzentration nach Transfektion mit siRNA-1 dar (\*\* $p=0,00012$ ), wogegen kein signifikanter Unterschied zur siRNA-2 Transfektion vorlag. Die Transfektion mit siRNA-2 zeigte einen hoch signifikant besseren ATP-Gehalt im Vergleich zur siRNA-1 (\*\* $p=0,0000339$ ).

Die ATP-Konzentration sank hoch signifikant zum Zeitpunkt 48 h bei den transfizierten (siRNA-1 \*\* $p=0,00000042$ , siRNA-2 \*\* $p=0,00031$ , siRNA-K \*\* $p=0,00013$ ) in Bezug auf die untransfizierten Zellen. Im Vergleich mit HiPerFect zeigte nur die Transfektion mit siRNA-1 eine signifikante ATP-Reduktion (\*\* $p=0,00067$ ). Die HiPerFect-behandelten C57Bl-Zellen hatten ebenfalls eine signifikante Reduktion des ATP-Gehaltes im Vergleich zu den Untransfizierten (\*\* $p=0,00054$ ). Das ATP-Level von siRNA-1 transfizierten Zellen war hoch signifikant reduziert bezogen auf siRNA-2 (\*\* $p=0,000159$ ) und Kontroll-siRNA (\*\* $p=0,000399$ ).

Der ATP-Gehalt der transfizierten C57Bl-Zellen veränderte sich in folgender Weise 72 h nach Transfektion: Die untransfizierten Zellen zeigten ein hoch signifikant höheres ATP-Level im Vergleich zu siRNA-1 (\*\* $p=0,000000324$ ), siRNA-2 (\*\* $p=0,00044$ ) und Kontroll-siRNA (\*\* $p=0,000072$ ). Die HiPerFect-behandelten Zellen unterschieden sich durch ihr hochsignifikant höheres ATP-Level von den siRNA-1 transfizierten Zellen (\*\* $p=0,00036$ ) und einem hochsignifikant niedrigerem ATP-Gehalt bezogen auf die untransfizierten Zellen (\*\* $p=0,000042$ ). Ein weiterer signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen siRNA-1 (niedrigster ATP-Gehalt) zu siRNA-2 (\*\* $p=0,00004454$ ) und zu siRNA-K (\*\* $p=0,00012$ ).

Das ATP-Level zeigte nach 96 h einen hochsignifikanten Abfall beim Vergleich der untransfizierten Zellen mit den HiPerFect-behandelten (\*\* $p=0,0000069$ ), den siRNA-1 transfizierten (\*\* $p=0,00000032$ ), den siRNA-2 transfizierten (\*\* $p=0,0015$ ) und den Kontroll-siRNA transfizierten (\*\* $p=0,0037$ ). Die HiPerFect-behandelten Zellen hatten einen signifikant höheren ATP-Gehalt als die siRNA-1 transfizierten

Zellen (\*\* p=0,0084) und einen hochsignifikant höheren ATP-Gehalt als die siRNA-2 transfizierten (\*\* p=0,000047) und Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (\*\* p=0,0000005). Das ATP-Level der siRNA-1 transfizierten Zellen war im Vergleich mit siRNA-2 (\*\* p= 0,00000315) und siRNA-K (\*\* p=0,00000039) hoch signifikant erniedrigt.

	siRNA-1	siRNA-2	siRNA-K	u+HiP	untransf.
<b>24h</b>	467488 ±20764 <sup>°°°</sup>	704187 ±42259	719337 ±50687		
<b>48h</b>	495920 ±12114 <sup>°°° *** ###</sup>	603697 ±21325 <sup>°°° ***</sup>	589945 ±19375 <sup>***</sup>	607321 ±25708 <sup>***</sup>	825355 ±48099
<b>72h</b>	454111 ±38566 <sup>°°° *** ###</sup>	679174 ±24484 <sup>***</sup>	644725 ±16077 <sup>***</sup>	629782 ±17447 <sup>***</sup>	960414 ±64466
<b>96h</b>	467984 ±46086 <sup>°°° *** ##</sup>	756852 ±16603 <sup>*** ###</sup>	783437 ±10608 <sup>###</sup>	618765 ±22702 <sup>***</sup>	986614 ±61540

**Tab. 2:** ATP-Gehalt (in nM) nach 24-96 h Transfektionszeit aus 2 Transfektionen mit n=7-16 Einzelergebnissen, Traditionelles Protokoll. Die Bezeichnung „u+HiP“ steht für untransfizierte, mit *HiPerFect Transfection Reagent*® behandelte C57Bl-Zellen; „untransf.“ steht für unbehandelte C57Bl-Zellen; siRNA-K entspricht der Kontroll-siRNA. Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert ± Standardfehler (SF). \* bedeutet signifikant gegenüber untransfizierten Zellen; # bedeutet signifikant gegenüber u+HiP; ° bedeutet signifikant gegenüber siRNA-K (\*/#/° p<0,05; \*\*/##/°° p<0,01; \*\*\*/###/°°° p<0,005 nach Student's T-test).

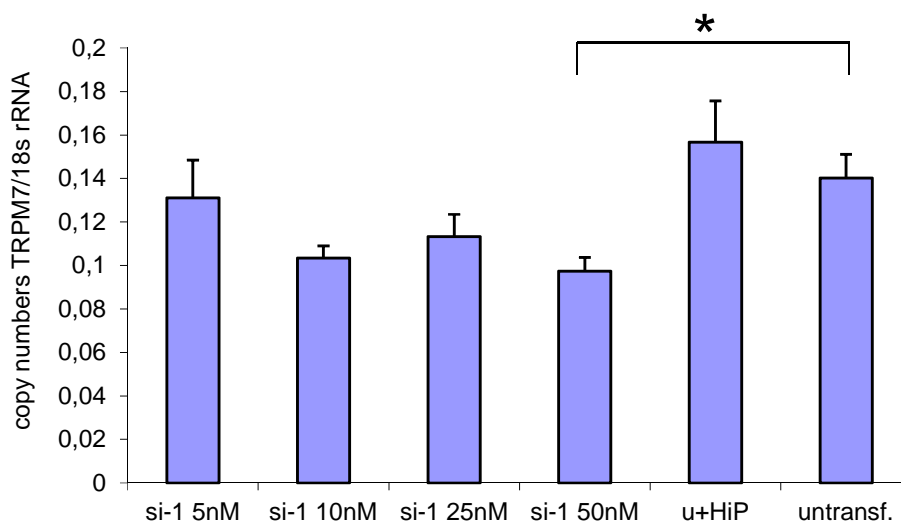
Aus den vorgestellten ATP-Messungen sind folgende Schlüsse zu ziehen: Der ATP-Gehalt ist von der siRNA-Konzentration im Wesentlichen nicht abhängig. Es besteht selbst nach langen Transfektionszeiten kein zusätzlicher Einbruch des niedrig-stabilen ATP-Levels unter Transfektion.

### **3.2.2. Quantifizierung von TRPM7 nach siRNA-Knockdown**

Nach Ermittlung des ATP-Gehaltes nach siRNA-Transfektionen mit verschiedenen Konzentrationen sowie nach verschiedenen Zeiten wurde für die entsprechenden Zellen jeweils die dazugehörige Quantifizierung von TRPM7 bezogen auf das Housekeeping-Gen 18s rRNA mittels Taqman RT-PCR durchgeführt.

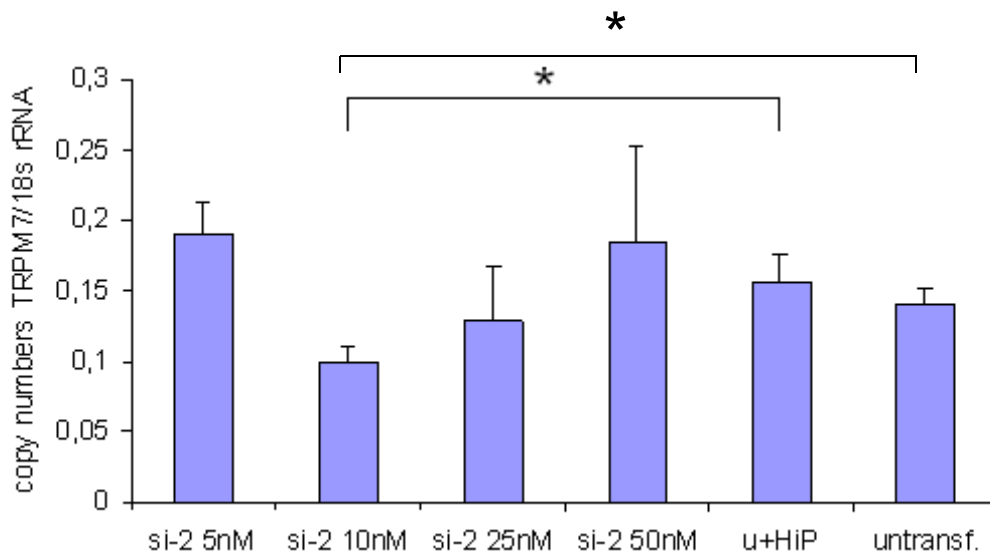
#### **3.2.2.1. Konzentrationsabhängigkeit**

Hierbei zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit des TRPM7-Knockdowns der verschiedenen siRNA-Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 25 nM und 50 nM) im Vergleich zur 18s rRNA: Je höher die siRNA-Konzentration, umso größer der Knockdown-Effekt. Nur bei 50 nM siRNA-1 zeigte sich in Bezug auf die untransfizierte Zellen eine signifikante TRPM7-Reduktion (\*  $p=0,046$ ). Bezogen auf die HiPerFect behandelten Zellen zeigte sich ebenfalls eine deutliche aber nicht signifikante Reduktion, wie in Abbildung 14 zu sehen ist.



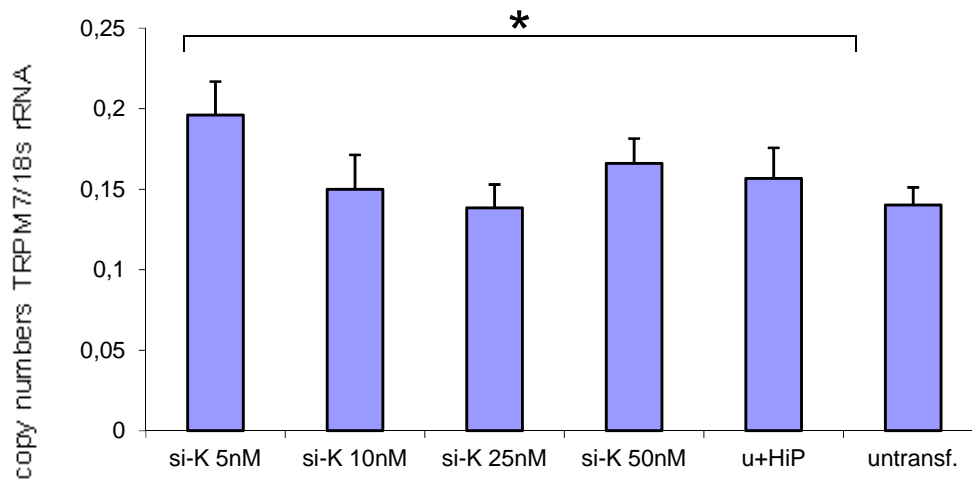
**Abb. 14:** Das Säulendiagramm enthält  $n=4-10$  Einzelergebnisse aus 1-3 unabhängigen Transfektionen nach Traditionellem Protokoll. Die Abbildung zeigt den Quotienten von TRPM7 mRNA zum Housekeeping-Gen 18s rRNA nach 48 h für die verschiedenen siRNA-1 Konzentrationen gegen TRPM7 und im Vergleich zu untransfizierten bzw. zu HiPerFect-behandelten C57BI-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p<0,05$  nach Student's T-test.

Bei den siRNA-2 transfizierten Zellen wurde ebenfalls eine signifikante TRPM7-Reduktion erzielt (Abb. 15). Bei der Transfektion mit 10 nM siRNA-2 in Bezug auf die mit HiPerFect behandelten (\*  $p=0,027$ ) und die untransfizierten Zellen (\*  $p=0,021$ ) wurde die signifikante Reduktion bereits bei geringeren Konzentrationen erzielt. Eine generelle Konzentrationsabhängigkeit wird nicht belegt, da bei 50 nM siRNA-2 keine signifikante Reduktion erzielt werden konnte.



**Abb. 15:** Das Säulendiagramm enthält  $n=8-11$  Einzelergebnisse aus 3 unabhängigen Transfektionen nach Traditionellem Protokoll. Die Abbildung zeigt den Quotienten von TRPM7 zum Housekeeping-Gen 18s nach 48 h für die verschiedenen siRNA-2-Konzentrationen gegen TRPM7 und im Vergleich zu untransfizierten bzw. zu HiPerFect-behandelten C57Bl-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\sigma$ ), \*  $p<0,05$  nach Student's T-test.

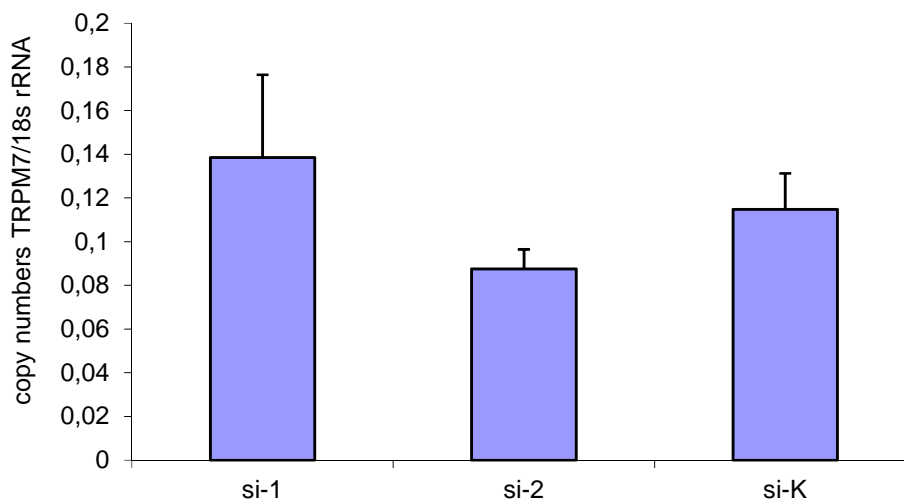
Bei der Quantität des TRPM7 zeigte sich wie erwartet keine Reduktion durch die Transfektion mit der Kontroll-siRNA, die Expression bei siRNA-K transfizierten Zellen lag sogar signifikant höher als bei den Untransfizierten (\*  $p=0,028$ ). Der Vergleich mit den HiPerFect-behandelten Zellen zeigte keine Signifikanz. Mit diesem Diagramm (Abb. 16) wurde der fehlende TRPM7-Knockdown durch die Kontroll-siRNA nachgewiesen.



**Abb. 16:** Das Säulendiagramm enthält n=7-10 Einzelergebnisse aus 3 unabhängigen Transfektionen nach Traditionellem Protokoll. Die Abbildung zeigt den Quotienten von TRPM7 zum Housekeeping-Gen 18s nach 48 h für die verschiedenen siRNA-Konzentrationen und im Vergleich zu untransfiziertem bzw. zu HiPerFect-behandeltem C57Bl-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p < 0,05$  nach Student's T-test.

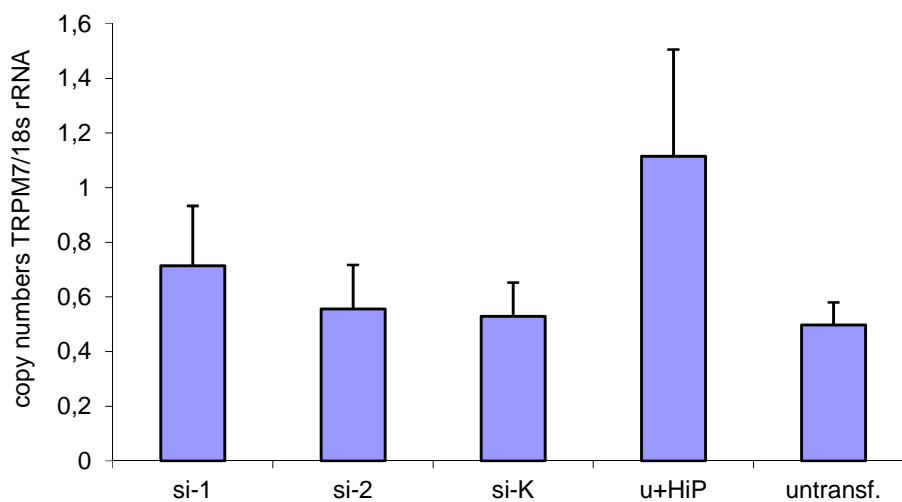
### 3.2.2.2. Zeitabhängigkeit

Die TaqMan-Quantifizierung von TRPM7 nach verschiedenen Zeitintervallen folgte der ATP-Bestimmung und zeigte nach 24h eine nicht signifikante TRPM7-Reduktion unter siRNA-2 sowie keine wesentliche TRPM7-Reduktion unter siRNA-1 (Abb. 17).



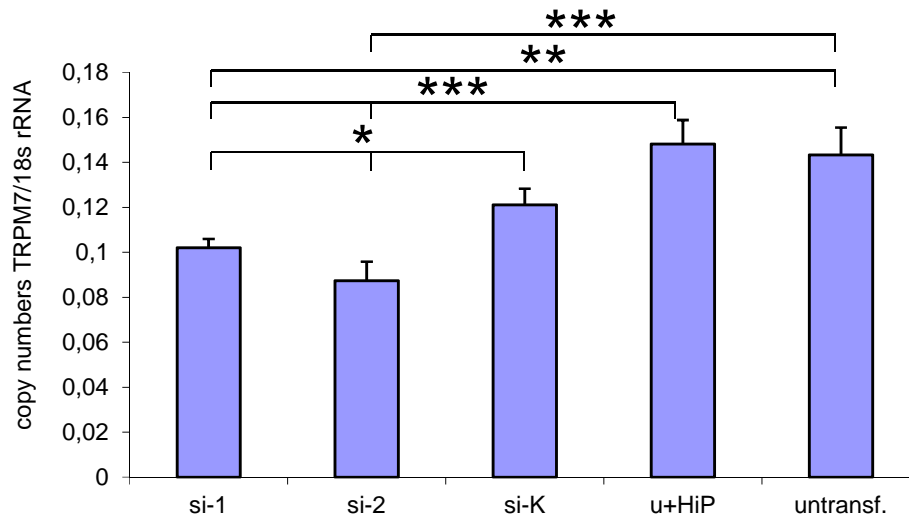
**Abb. 17:** Das Säulendiagramm zeigt n=7 Einzelergebnisse aus 2 unabhängigen Transfektionen nach Traditionellem Protokoll. Die Abbildung zeigt den Quotienten von TRPM7 zum Housekeeping-Gen 18s für den Zeitpunkt 24 h und im Vergleich zu si-K transfizierten C57Bl-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\pm$ ).

Nach 48 h zeigte sich eine deutliche, aber nicht signifikante TRPM7-Reduktion unter siRNA-2 im Vergleich zu den HiPerFect-behandelten Zellen (Abb. 18).



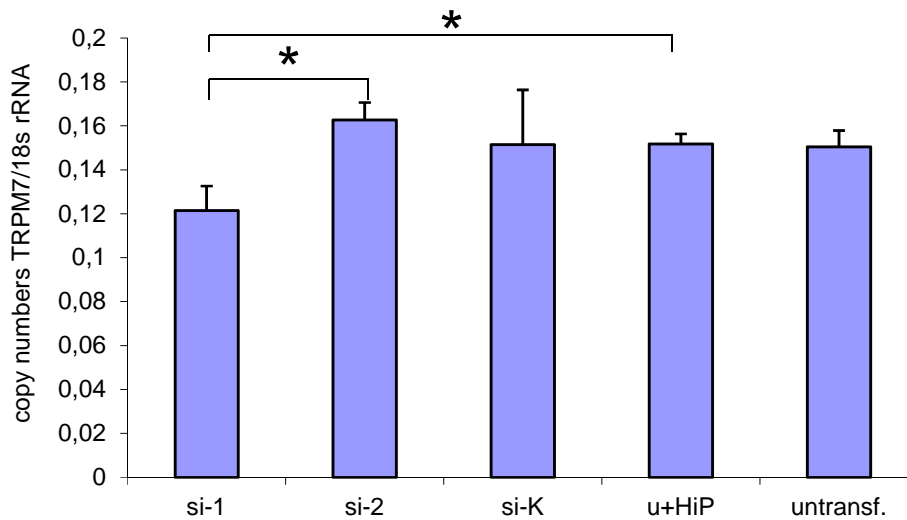
**Abb. 18:** Das Säulendiagramm besteht aus n=7-8 Einzelergebnissen aus 2 unabhängigen Transfektionen nach dem Traditionellen Protokoll. Die Abbildung zeigt den Quotienten von TRPM7 zum Housekeeping-Gen 18s für den Zeitpunkt 48 h und im Vergleich zu untransfizierten C57Bl-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\pm$ ).

Die sehr signifikante Herunterregulierung von TRPM7 durch siRNA-1 (\*\* p=0,0093) und hochsignifikante durch siRNA-2 (\*\*\*) p=0,0033) zeigte sich erst nach 72 h im Vergleich zu den Untransfizierten (Abb. 19). Die Zellen mit Kontroll-siRNA zeigten sich nicht signifikant reduziert bezogen auf die untransfizierten Zellen. Im Vergleich mit der HiPerFect-Behandlung zeigte siRNA-1 eine hochsignifikante Reduktion von TRPM7 (\*\*\*) p=0,002), siRNA-2 eine hochsignifikante Reduktion (\*\*\*) p=0,0009) und eine nicht signifikante Reduktion bei der Kontroll-siRNA. Unter siRNA-1 und -2 zeigte sich eine signifikante Reduktion im Vergleich mit der Kontroll-siRNA (\* p=0,0446 und \* p=0,0122).



**Abb. 19:** Das Säulendiagramm zeigt  $n=8$  Einzelergebnisse aus 2 unabhängigen Transfektionen nach Traditionellem Protokoll. Die Abbildung zeigt den Quotienten von TRPM7 zum Housekeeping-Gen 18s für den Zeitpunkt 72 h und im Vergleich zu untransfiziertem C57Bl-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  nach Student's T-test.

Die TRPM7-Reduktion verzeichnete keine Progredienz nach 96 h (Abb. 20). Es zeigte sich im Vergleich der siRNA-1 und -2 transfizierten Zellen ein signifikanter Unterschied in der TRPM7-Abnahme (\*  $p=0,0137$ ) unter siRNA-1. Bezogen auf die HiPerFect-behandelten Zellen zeigte sich eine signifikante TRPM7-Reduktion unter siRNA-1 (\*  $p=0,033$ ).



**Abb. 20:** Das Säulendiagramm zeigt  $n=8$  Einzelergebnisse aus 2 unabhängigen Transfektionen nach Traditionellem Protokoll. Die Abbildung zeigt den Quotienten von TRPM7 zum Housekeeping-Gen 18s für den Zeitpunkt 96 h und im Vergleich zu untransfizierten C57Bl-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p < 0,05$  nach Student's T-test.

Als Fazit aus den vorgestellten Ergebnissen ist der TRPM7-Knockdown bei siRNA-1 am erfolgreichsten. Zum Zeitpunkt 72 h war der TRPM7-Knockdown unter den siRNAs nachweisbar bei erhaltener Vitalität. Der zeitliche Verlauf zeigte nach 72 h keine weitere Progredienz in der TRPM7-Reduktion.

Zum Vergleich wurde das Fast-Forward Protokoll auf die C57Bl-Zellen angewendet. Es wurde überprüft, ob sich der ATP-Gehalt nach dieser Transfektion auf einem höheren Level befindet und wie effektiv der TRPM7-Knockdown im Vergleich zum Traditionellen Protokoll ist (Tab. 3).

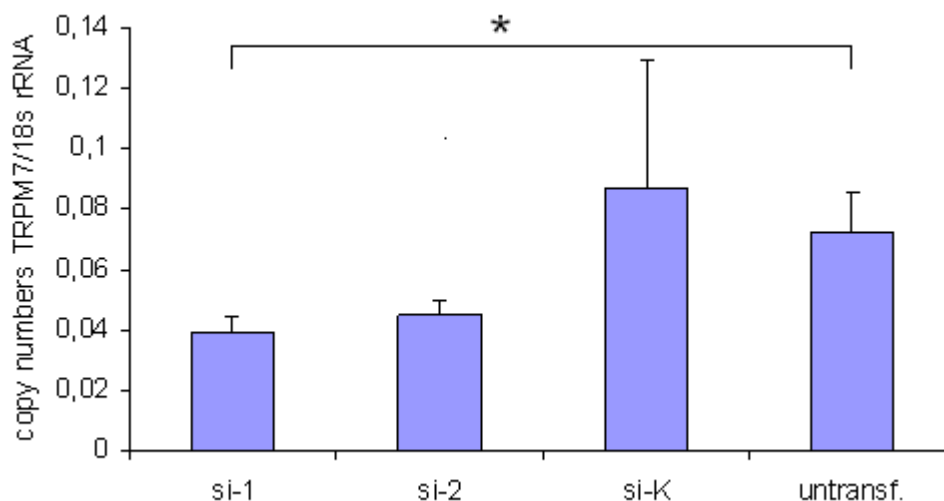
Beim Fast-Forward Protokoll zeigte sich nach 24 h ebenfalls ein reduzierter ATP-Gehalt nach Transfektion im Vergleich zu den untransfizierten Zellen. Der ATP-Gehalt von Kontroll-siRNA transfizierten Zellen war signifikant niedriger als bei siRNA-1 Transfektion (\*  $p=0,0353$ ).

Der ATP-Gehalt der transfizierten Zellen zeigte einen nicht signifikanten Abfall im Gegensatz zu den Untransfizierten nach 48 h.

	24 h	48 h
siRNA-1	259314,4±16498°	339935,6±35032
siRNA-2	234401,9±15893	320427,7±32985
siRNA-K	215955,9±11462	407297,5±34357
untransf.	664904,4±48406	876102,1±41234

**Tab. 3:** ATP-Gehalt (in nM) nach 24 und 48 h Transfektionszeit aus 6 Transfektionen mit n=48 Einzelergebnissen, Fast-Forward Protokoll. Die Bezeichnung „u+HiP“ steht für untransfizierte, mit *HiPerFect Transfection Reagent®* behandelte C57BI-Zellen; „untransf.“ steht für unbehandelte C57BI-Zellen; siRNA-K entspricht der Kontroll-siRNA. Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert ± Standardfehler (SF). \* bedeutet signifikant gegenüber untransfizierten Zellen; # bedeutet signifikant gegenüber u+HiP; ° bedeutet signifikant gegenüber siRNA-K.

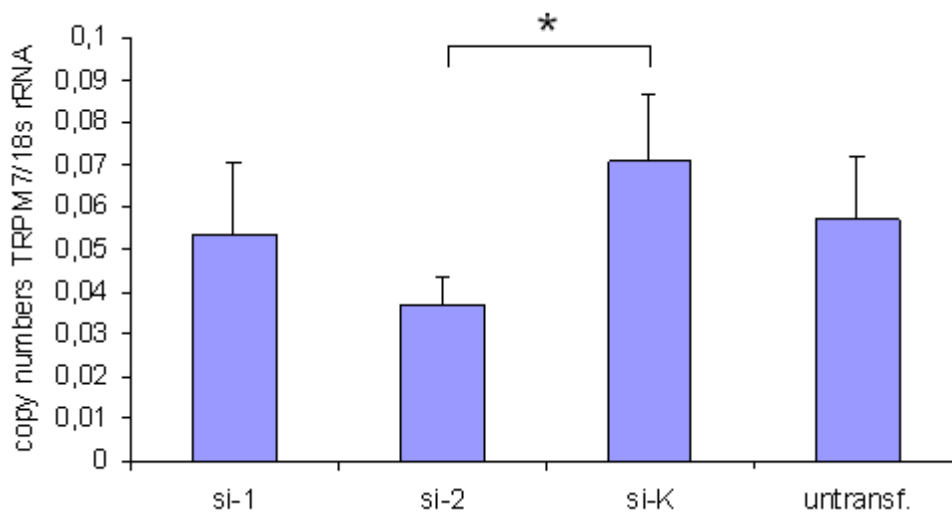
Nach 24 h war bei der Taqman-Quantifizierung eine signifikante TRPM7-Reduktion unter siRNA-1 in Bezug auf untransfizierte Zellen (\* p=0,028) zu verzeichnen (Abb. 21).



**Abb. 21:** Das Säulendiagramm zeigt n=15-16 Einzelergebnisse aus 4 unabhängigen Transfektionen nach dem Fast-Forward Protokoll. Die Abbildung zeigt den Quotienten von TRPM7 zum Housekeeping-Gen 18s nach 24 h und im Vergleich zu

untransfizierten C57Bl-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\pm$ ), \*  $p < 0,05$  nach Student's T-test.

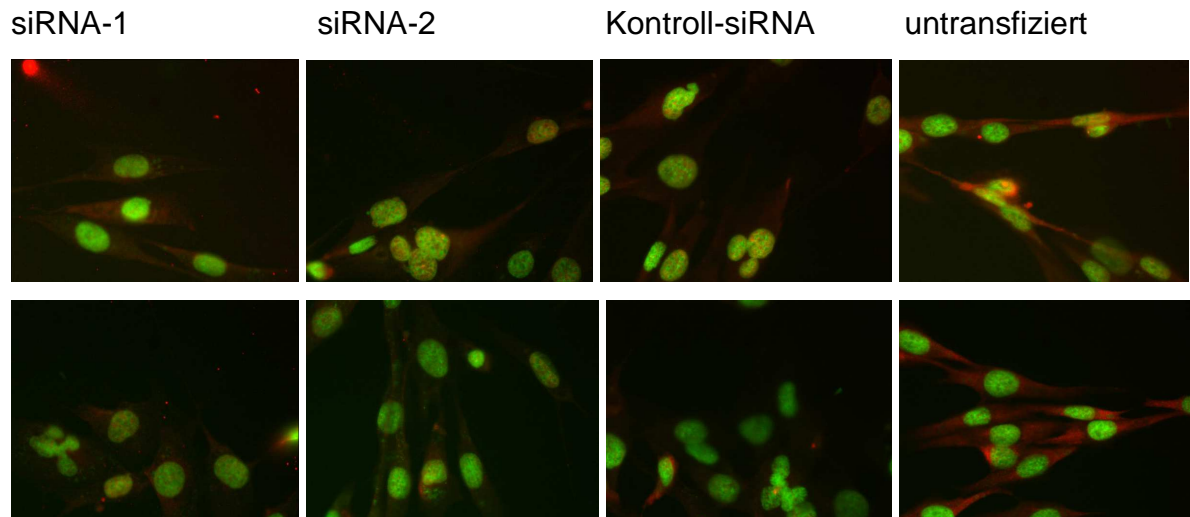
Bei der TRPM7-Quantifizierung zeigte sich nach 48 h eine deutlich signifikante Downregulation von TRPM7 unter siRNA-2 (\*  $p = 0,019$ ) bezogen auf die Kontroll-siRNA (Abb. 22). Unter siRNA-1 zeigte sich auch hier eine deutliche, aber nicht signifikante TRPM7-Reduktion.



**Abb. 22:** Das Säulendiagramm zeigt  $n = 15-16$  Einzelergebnisse aus 4 unabhängigen Transfektionen nach dem Fast-Forward Protokoll. Die Abbildung zeigt den Quotienten von TRPM7 zum Housekeeping-Gen 18s nach 48 h im Vergleich zu untransfizierten C57Bl-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\pm$ ), \*  $p < 0,05$  nach Student's T-test.

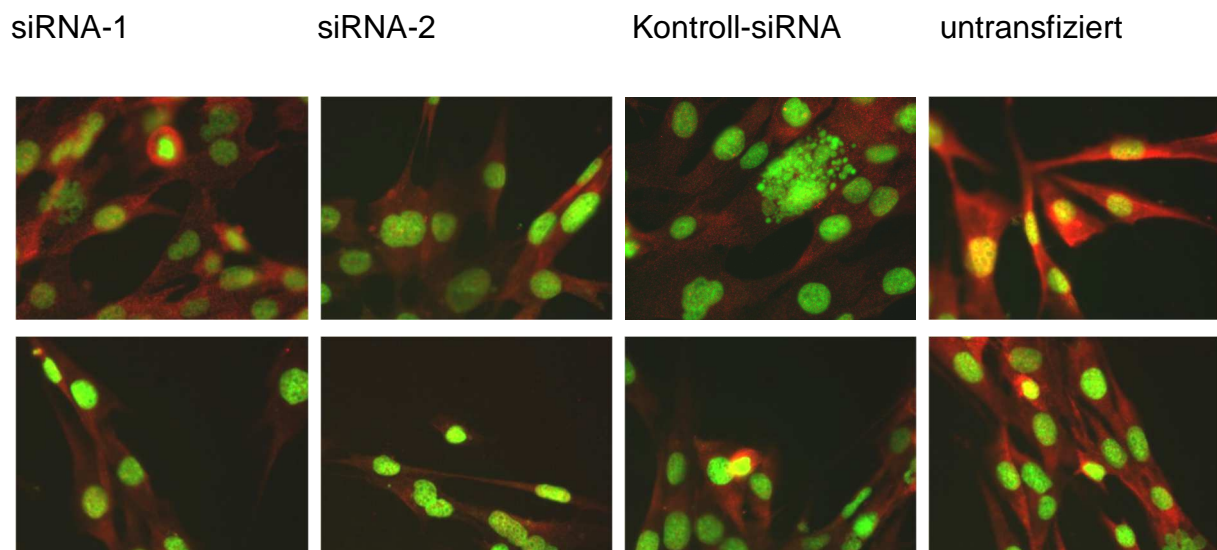
### **3.2.3. Immunhistochemischer Nachweis von TRPM7-Knockdown in-situ**

Wie auch in den Vorversuchen mit TRPC6 erfolgte auch der immunhistochemische Nachweis eines deutlichen TRPM7-Knockdown in den Membranen im Vergleich zur Kontroll-siRNA und den untransfizierten C57Bl-Zellen 24 h nach siRNA-Transfektion (Abb. 23).



**Abb. 23:** Konfokale Lasermikroskopie siRNA-transfizierter C57Bl-Zellen nach 24 h. Zellkerne grün (Alexa 488); TRPM7-Anfärbung rot (Alexa 568). Obere Zeile nach Transfektion, untere Zeile nach 24 h.

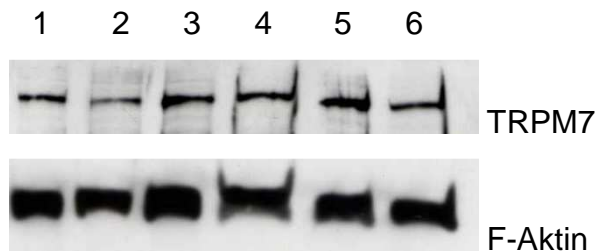
Nach 48 h war keine weitere TRPM7-Reduktion im Vergleich zur 24 h Aufnahme zu beobachten (Abb. 24).



**Abb. 24:** Konfokale Lasermikroskopie siRNA-transfizierter C57BI-Zellen nach 48 h. Zellkerne grün (Alexa 488); TRPM7-Anfärbung rot (Alexa 568). Obere Zeile nach Transfektion, untere Zeile nach 48 h.

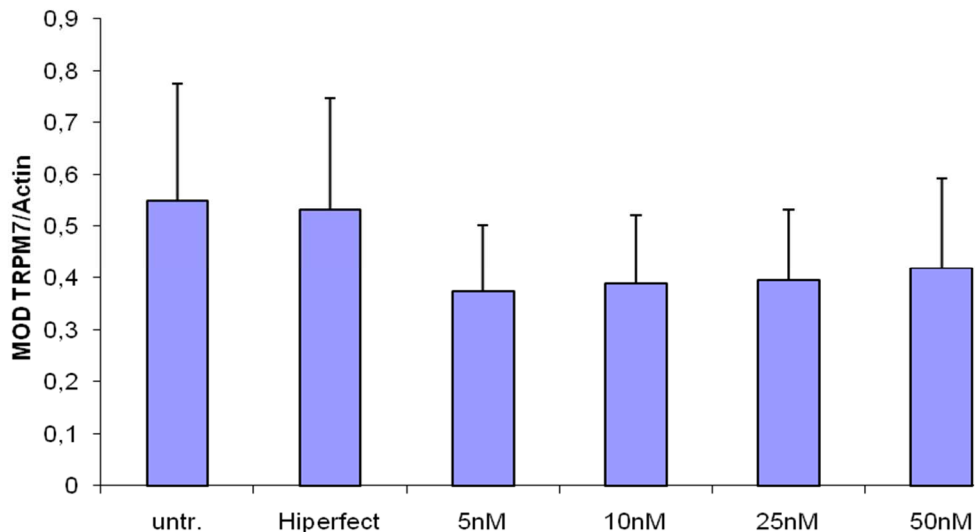
### **3.2.4. Nachweis von TRPM7-Knockdown mittels Western Blot**

Auf der Proteinebene konnte mit siRNA-2 Transfektion die deutliche TRPM7 Reduktion in C57BI-Zellen erzielt werden (Abb. 25). Das Ergebnis zeigte keine Proportionalität zur Konzentration.



**Abb. 25:** Westernblot bei C57BI-Zellen. Bande 1: untransfiziert, Bande 2: + HiPerFect, Bande 3: + siRNA-2 5nM, Bande 4: + siRNA-2 10 nM, Bande 5: siRNA-2 25 nM, Bande 6: siRNA-2 50 nM

Im folgenden Säulendiagramm (Abb. 26) zeigte sich eine nicht signifikante aber deutliche Reduktion von TRPM7 nach siRNA-2 Transfektion. Auch hier fand sich keine Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration.



**Abb. 26:** Säulendiagramm mit TRPM7/Actin-Quotient zur Darstellung der Proteinreduktion, im Vergleich verschiedene siRNA-2 Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\tau$ ).

### **3.3. Differenzierung der C57BI-Zellen nach TRPM7-Knockdown**

Die Differenzierungsstrecke wurde mittels mikroskopischen Fotos dokumentiert. Im Folgenden ist der zeitliche Verlauf von Tag 0 bis Tag 6 dargestellt. Es wurde mit 5 nM (37,5 ng) siRNA nach dem Fast Forward Protokoll transfiziert. Es zeigte sich eine deutlich bessere Differenzierung und Zellwachstum bei untransfizierten C57BI-Zellen. Nach 24 h waren hier spindelförmige Myoblasten sichtbar und nach 48 h konnte man die Teilung und Parallelisierung der Myoblasten beobachten. Anschließend fand eine Fusion der Myoblasten zu vielkernigen Synzytien (Calcium-abhängig) und eine verstärkte Synthese von Muskelproteinen statt.

Die Differenzierung der siRNA transfizierten Zellen zeigte sich lichtmikroskopisch deutlich eingeschränkt (Abb. 27). Zusätzlich zum Proliferationsstillstand kam es bei einigen Zellen zum Absterben.

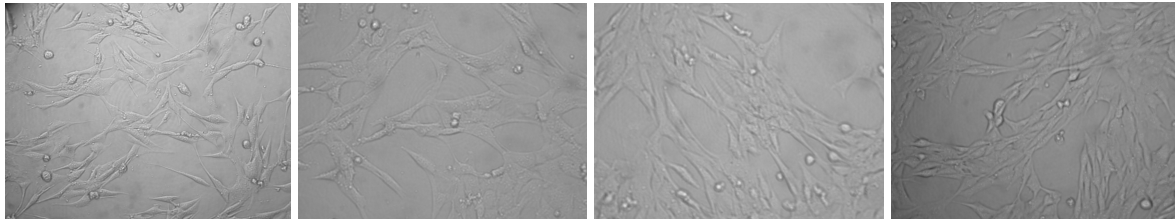
0d

si-1

si-2

si-K

untransfiziert



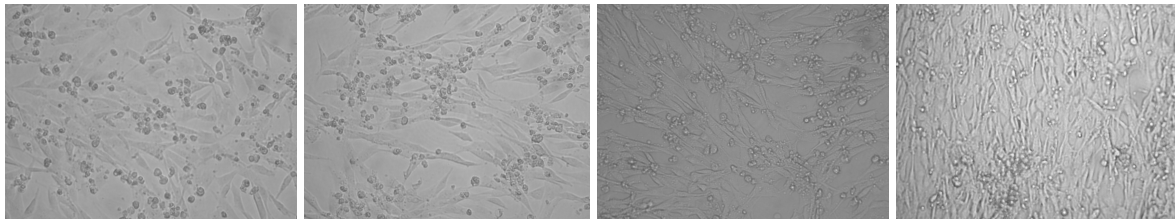
2d

si-1

si-2

si-K

untransfiziert



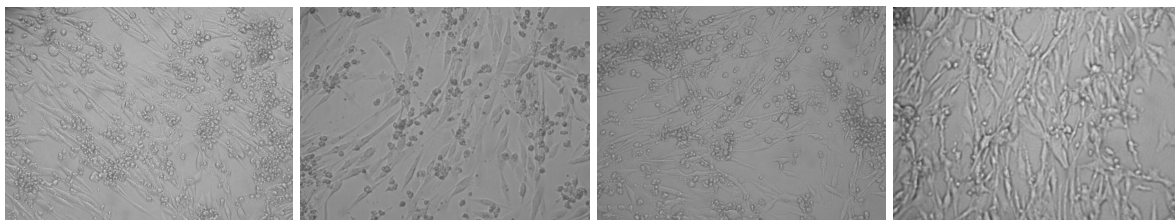
4d

si-1

si-2

si-K

untransfiziert



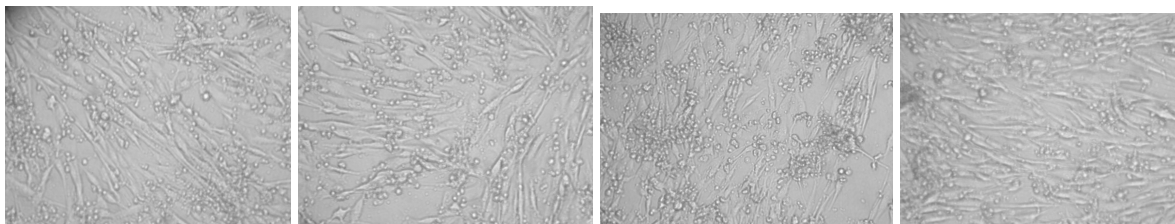
6d

si-1

si-2

si-K

untransfiziert

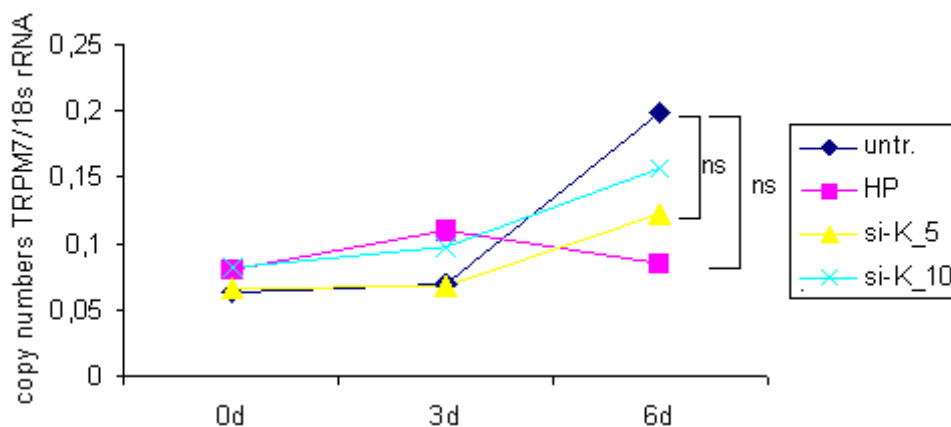


**Abb. 27:** fotografische Dokumentation der Differenzierungsstrecke nach Fast Forward Transfektion mit 5 nM (37,5 ng) siRNA nach 0, 2, 4, 6 Tagen.

Nachdem die Differenzierungsfähigkeit der C57Bl-Zellen unter Transfektion photographisch überprüft wurden, folgte eine Differenzierungsstrecke nach siRNA-Transfektion (Fast-Forward Protokoll) über 6 Tage. Es wurde mit zwei Konzentrationen siRNA (5 und 10 nM) gearbeitet. Im Zentrum der Untersuchung stand die Quantifizierung von TRPM7 und der Marker für Muskeldifferenzierung Ryanodinrezeptor 1 und SCN4A in Bezug auf das Housekeeping-Gen 18s. Diese Marker zeigten im Vorfeld eine quantitative Vermehrung bei fortschreitender Muskeldifferenzierung. Als Housekeeping-Gen wurde das im Zytoskelett vorhandene  $\alpha$ -Aktin zum Vergleich verwendet.

Im Anschluss wurden die jeweiligen Signifikanzen nach 6 Tagen ermittelt.

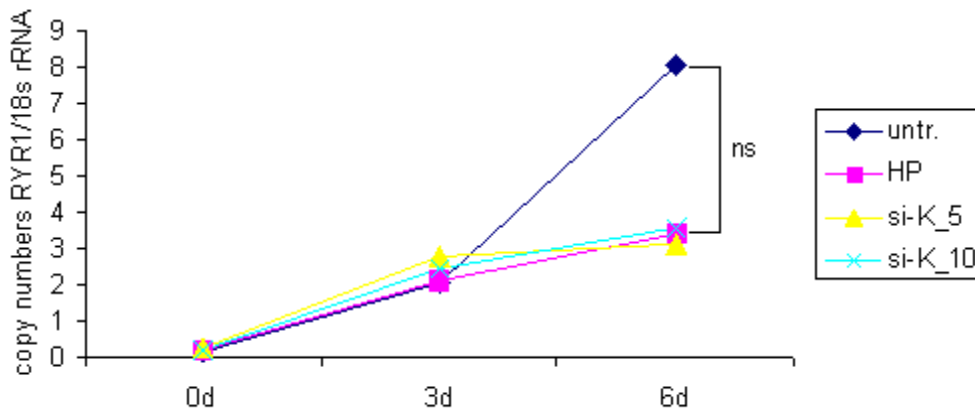
Bei der Quantifizierung von TRPM7 in Bezug auf 18s rRNA zeigte die Transfektion mit 5 nM Kontroll-siRNA wie erwartet keine signifikanten Auswirkungen ( $p=0,27$  ns) in Bezug auf die untransfizierten Zellen (Abb. 28). Ebenfalls nicht signifikant war die Differenz zwischen untransfizierten und HiPerFect behandelten Zellen ( $p=0,12$  ns). Trotzdem zeigten die unbehandelten Zellen einen höheren TRPM7-Gehalt als die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen.



**Abb. 28:** Das Liniendiagramm zeigt  $n=5-7$  Einzelergebnisse aus einer Differenzierungsstrecke durchgeführt nach dem Fast-Forward Protokoll. Die Abbildung zeigt den Quotienten vom TRPM7 zum Housekeeping-Gen 18s, verglichen wurden 5 und 10 nM Kontroll-siRNA mit untransfizierten C57Bl-Zellen zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d.

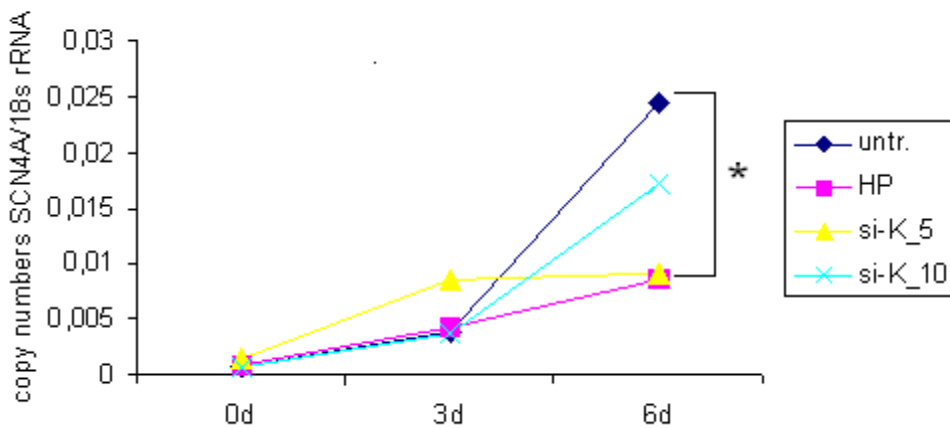
Zum Vergleich wurde im Folgenden der Ryanodinrezeptor bei den Kontroll-siRNA transfizierten Zellen untersucht (Abb. 29). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Ryanodinrezeptors 1 zwischen der Kontroll-siRNA in den

Konzentrationen 5 und 10 nM und den untransfizierten Zellen. Die untransfizierten zu den HiPerFect behandelten Zellen zeigten eine nicht signifikante Differenz bezüglich des Ryanodinrezeptors 1.



**Abb. 29:** Das Liniendiagramm zeigt  $n=5-7$  Einzelergebnisse aus einer Differenzierungsstrecke durchgeführt nach dem Fast-Forward Protokoll. Die Abbildung zeigt den Quotienten vom Ryanodinrezeptor 1 zum Housekeeping-Gen 18s verglichen wurden 5 und 10 nM siRNA-1 gegen TRPM7 mit untransfizierten C57Bl-Zellen zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d.

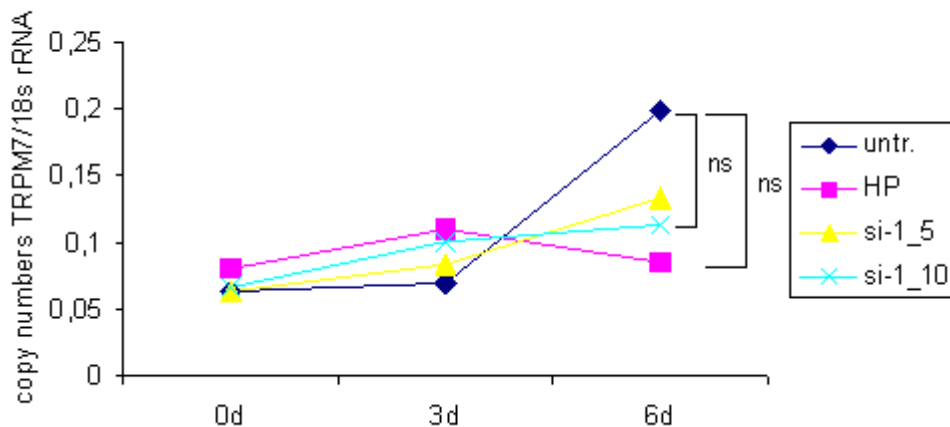
Bei der Quantifizierung des Differenzierungsmarkers SCN4A fiel der signifikante Unterschied zwischen den untransfizierten und den mit HiPerFect (\*  $p=0,026$ ) bzw. 5 nM Kontroll-siRNA (\*  $p=0,03$ ) behandelten Zellen auf (Abb. 30). Dies ist weniger auf den Einfluss der siRNA zurückzuführen, als auf den Einfluss des HiPerFects auf die Zellen. Es bestand keine Signifikanz von den untransfizierten Zellen zu der 10 nM si-K ( $p=0,32$ ).



**Abb. 30:** Liniendiagramm (Fast Forward Protokoll) des Quotienten vom Ryanodinrezeptor 1 zum Housekeeping-Gen 18s, verglichen wurden 5 und 10 nM Kontroll-siRNA gegen TRPM7 mit untransfizierten C57Bl-Zellen zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d. Dargestellt sind die Signifikanzen nach 6 d, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  nach Student's T-test.

Abschließend lässt sich zur Differenzierung unter Kontroll-siRNA folgendes zusammenfassen: Die Entwicklung der Zellen ist nach Transfektion erheblich eingeschränkt. Diese Tatsache lässt sich nicht nur bei den siRNA-transfizierten Zellen, sondern bereits bei Einsatz des HiPerFectes ohne zusätzliche siRNA erkennen. Die untransfizierten Zellen differenzieren – wie erwartet – am besten. Die Differenzierung der transfizierten Zellen ist nicht abhängig von der Menge der siRNA.

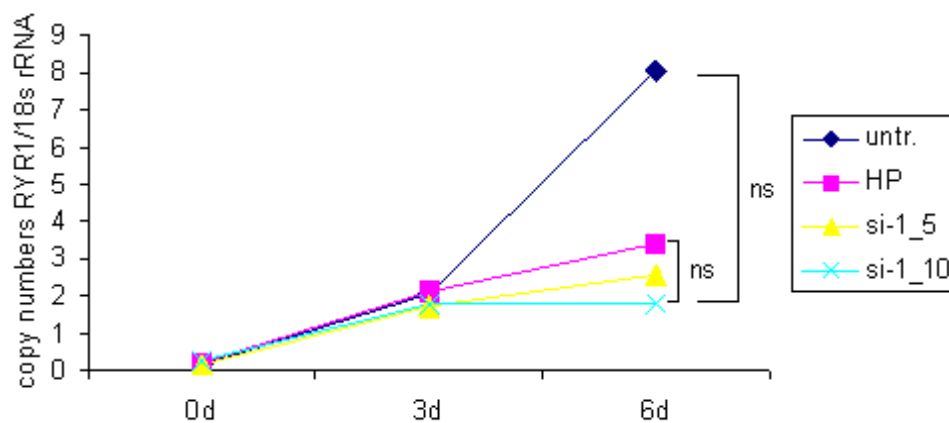
Im Folgenden wurde das Differenzierungsverhalten unter siRNA-1 Transfektion in verschiedenen Konzentrationen untersucht (Abb. 31). Beim Vergleich der 5 und 10 nM siRNA-1 mit den untransfizierten Zellen zeigte sich ein deutliche aber nicht signifikante Reduktion von TRPM7 auf RNA-Ebene. Zusätzlich war auch hier eine Beeinträchtigung der Zellen durch die HiPerFect-Behandlung zu verzeichnen.



**Abb. 31:** Das Liniendiagramm zeigt  $n=5-7$  Einzelergebnisse aus einer Differenzierungsstrecke durchgeführt nach dem Fast-Forward Protokoll. Die Abbildung zeigt den Quotienten vom TRPM7 zum Housekeeping-Gen 18s verglichen wurden 5 und 10 nM siRNA-1 gegen TRPM7 mit untransfizierten C57Bl-Zellen zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d.

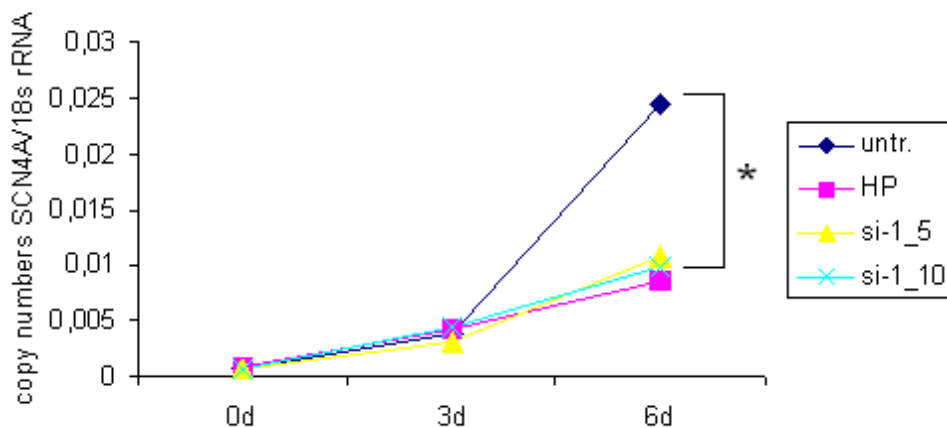
Der Ryanodinrezeptor 1 erwies sich am 6. Tag bei 5 und 10 nM ( $p=0,065$  ns) siRNA-1 transfizierten Zellen deutlich aber nicht signifikant reduziert im Vergleich mit den Untransfizierten (Abb. 32).

Der Unterschied zwischen den mit HiPerFect und den mit 10 nM siRNA-1 behandelten Zellen war nicht signifikant, jedoch war der Ryanodinrezeptor 1 unter siRNA-1 quantitativ vermindert. Das HiPerFect schränkte auch hier die Differenzierungsfähigkeit der Zellen ein.



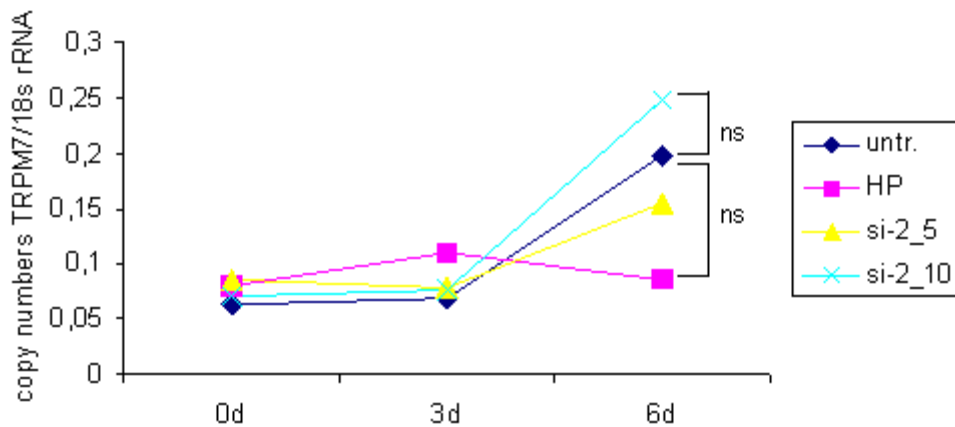
**Abb. 32:** Liniendiagramm (Fast Forward Protokoll) des Quotienten vom Ryanodinrezeptor 1 zum Housekeeping-Gen 18s, verglichen wurden 5 und 10nM siRNA-1 gegen TRPM7 mit untransfizierten C57Bl-Zellen zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d.

Es zeigte sich ein signifikante Reduktion des zweiten untersuchten Differenzierungsmarkers SCN4A unter 5 nM siRNA-1 (\*  $p=0,042$ ) und 10 nM siRNA-1 (\*  $p=0,026$ ) im Vergleich mit den untransfizierten Zellen (Abb. 33). Die mit HiPerFect behandelten Zellen waren ebenfalls in ihrer Differenzierung signifikant eingeschränkt.



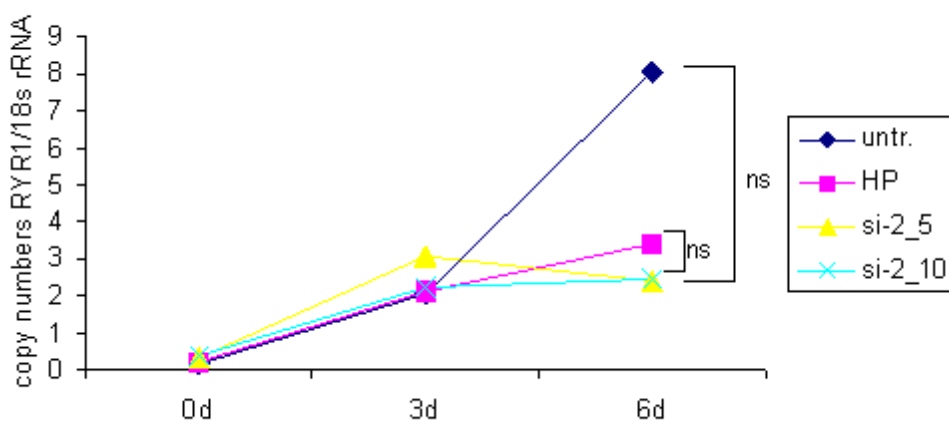
**Abb. 33:** Liniendiagramm (Fast Forward Protokoll) des Quotienten von SCN4A zum Housekeeping-Gen 18s, verglichen wurden 5 und 10 nM siRNA-1 gegen TRPM7 mit untransfizierten C57Bl-Zellen zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d. Dargestellt sind die Signifikanzen nach 6 d, \*  $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,005$  nach Student's T-test.

Zum Vergleich wurden die Zellen mit der siRNA-2 transfiziert. Hierbei zeigte sich eine nicht eindeutige TRPM7-Reduktion unter 5 nM siRNA-2 bezogen auf die untransfizierten Zellen (Abb. 34). Die höhere siRNA-Konzentration verzeichnete keinen Erfolg.



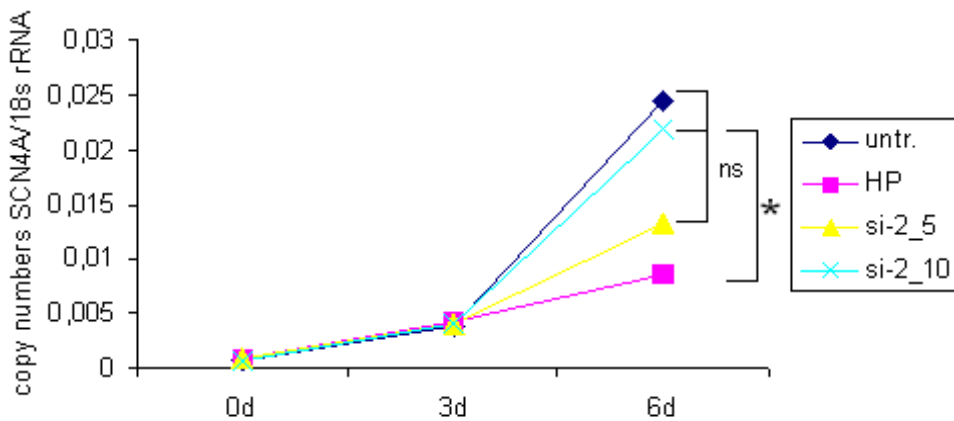
**Abb. 34:** Das Liniendiagramm zeigt  $n=5-7$  Einzelergebnisse aus einer Differenzierungsstrecke durchgeführt nach dem Fast-Forward Protokoll. Die Abbildung zeigt den Quotienten vom TRPM7 zum Housekeeping-Gen 18s verglichen wurden 5 und 10 nM siRNA-2 gegen TRPM7 mit untransfizierten C57BI-Zellen zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d.

Der deutliche Unterschied zwischen untransfizierten Zellen zu 10 nM siRNA-2 ( $p=0,093$  ns) und 5 nM siRNA-2 ( $p=0,092$  ns) war nicht signifikant. Der Gehalt an Ryanodinrezeptor 1 war auch unter HiPerFect deutlich reduziert und belegte ebenso die mangelnde Differenzierung unter HiPerFect (Abb. 35).



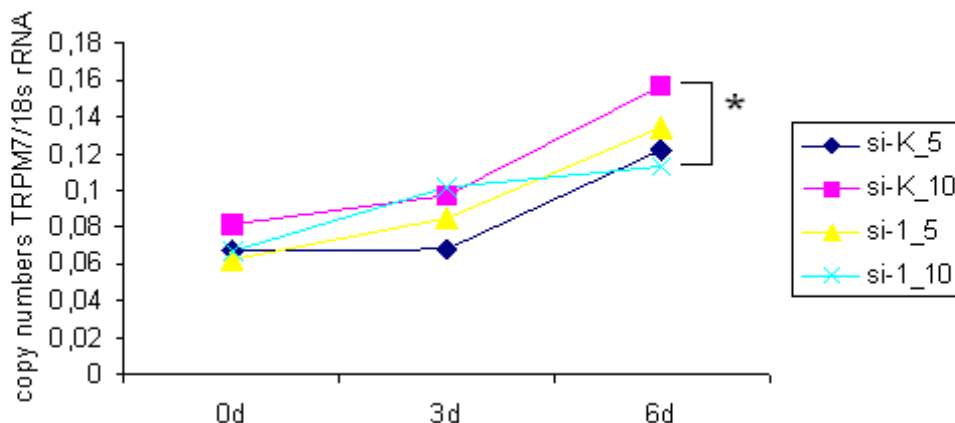
**Abb. 35:** Liniendiagramm (Fast Forward Protokoll) des Quotienten vom Ryanodinrezeptor 1 zum Housekeeping-Gen 18s, verglichen wurden 5 und 10 nM siRNA-2 gegen TRPM7 mit untransfizierten C57BI-Zellen zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d.

Die Quantität von SCN4A war nicht signifikant höher bei untransfizierten im Vergleich zu 5 nM siRNA-2 ( $p=0,11$  ns) und zu 10 nM siRNA-2 behandelten Zellen ( $p=0,75$  ns). Dagegen zeigte sich eine signifikante SCN4A-Reduktion unter HiPerFect verglichen mit 10 nM siRNA-2 behandelten Zellen ( $p=0,034$  \*). Der Unterschied von 5 zu 10 nM siRNA-2 war nicht signifikant ( $p=0,17$  ns). Hierbei zeigte sich eine Unabhängigkeit bezogen auf die siRNA-Konzentration (Abb. 36).



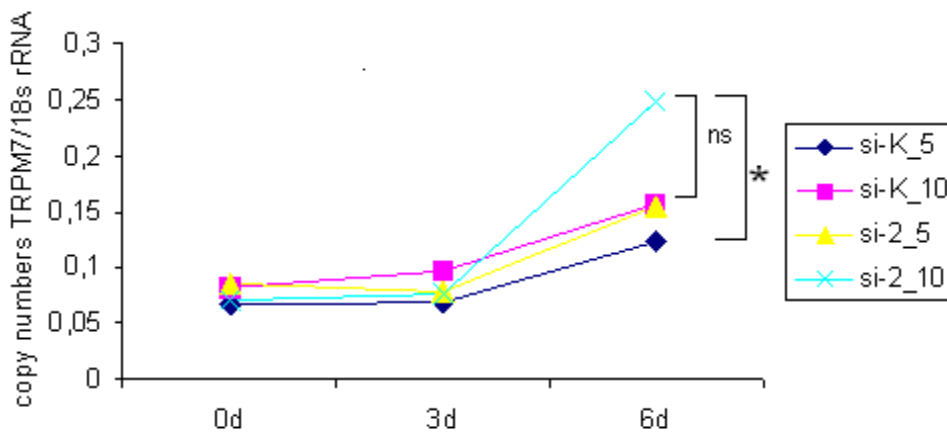
**Abb. 36:** Liniendiagramm (Fast Forward Protokoll) des Quotienten von SCN4A zum Housekeeping-Gen 18s, verglichen wurden 5 und 10 nM siRNA-2 gegen TRPM7 mit untransfizierten C57Bl-Zellen zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d. Dargestellt sind die Signifikanzen nach 6 d, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  nach Student's T-test.

Bei dem Vergleich des TRPM7/18s-Quotienten von siRNA-1 (gegen TRPM7) zur Kontroll-siRNA zeigte sich eine signifikante TRPM7-Reduktion unter siRNA-1 bei den Konzentrationen 10 nM (\*  $p=0,0436$ ) in Abb. 37.



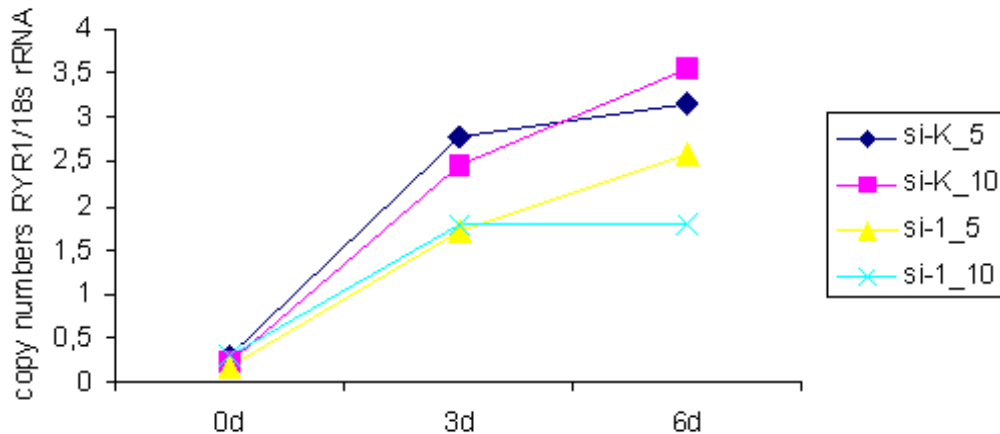
**Abb. 37:** Liniendiagramm (Fast Forward Protokoll) des Quotienten von TRPM7 zum Housekeeping-Gen 18s, verglichen wurden 5 und 10 nM siRNA-1 gegen 5 und 10 nM Kontroll-siRNA zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d. Dargestellt sind die Signifikanzen nach 6 d, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  nach Student's T-test.

Ebenso wurden die siRNA-2 (gegen TRPM7) und die Kontroll-siRNA zum Vergleich aufgetragen (Abb. 38). Hierbei zeigte sich ein nicht signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll-siRNA und der siRNA-2 in der Konzentration 10 nM ( $p = 0,09$  ns). Der Vergleich 5 und 10 nM siRNA-2 erwies sich ebenfalls als nicht signifikant ( $p = 0,17$  ns), wohingegen unter 10 nM siRNA-2 eine signifikant höhere Menge an TRPM7 vorhanden war in Bezug auf 5 nM Kontroll-siRNA (\*  $p = 0,0436$ ).



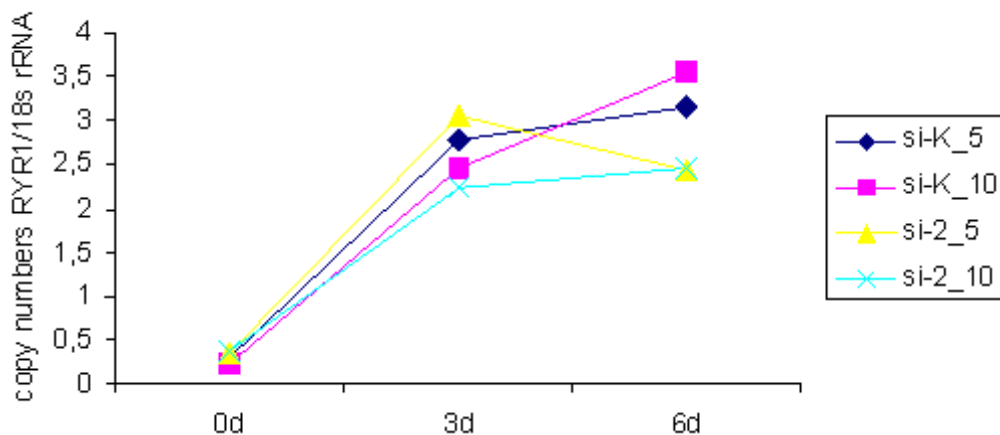
**Abb. 38:** Liniendiagramm (Fast Forward Protokoll) des Quotienten von TRPM7 zum Housekeeping-Gen 18s, verglichen wurden 5 und 10 nM siRNA-2 gegen 5 und 10 nM Kontroll-siRNA zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d. Dargestellt sind die Signifikanzen nach 6 d, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  nach Student's T-test.

Beim Vergleich des Ryanodinrezeptors 1 unter siRNA-1 und Kontroll-siRNA behandelten Zellen zeigte sich ein deutlicher aber nicht signifikanter Unterschied zwischen 5 und 10 nM Kontroll-siRNA zu 5 bzw. 10 nM siRNA-1. Quantitativ war der Ryanodingehalt unter Kontroll-siRNA höher (Abb. 39).



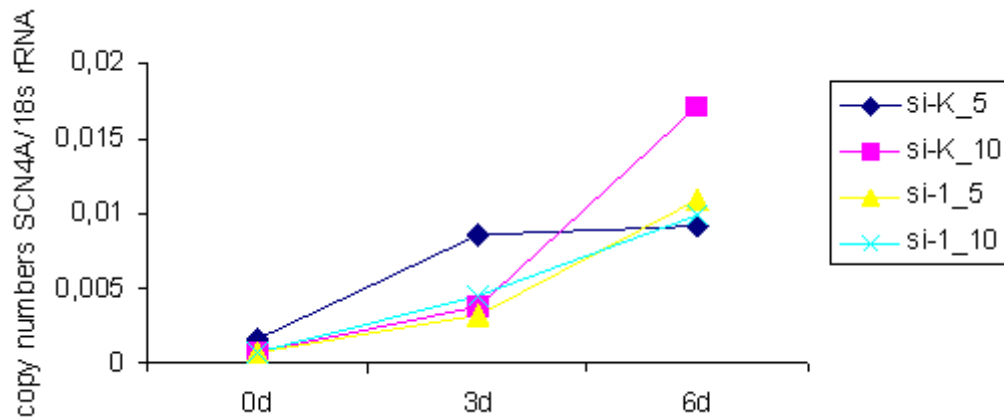
**Abb. 39:** Liniendiagramm (Fast Forward Protokoll) des Quotienten von RYR1 zum Housekeeping-Gen 18s, verglichen wurden 5 und 10 nM siRNA-1 gegen 5 und 10 nM Kontroll-siRNA zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d.

Beim RYR1-Vergleich unter Kontroll-siRNA und siRNA-2 (Abb. 40) zeigte sich ebenfalls ein deutliche aber nicht signifikante Reduktion unter siRNA-2 (5 nM und 10 nM Kontroll-siRNA zu 5 bzw. 10 nM siRNA-2 war nicht signifikant).



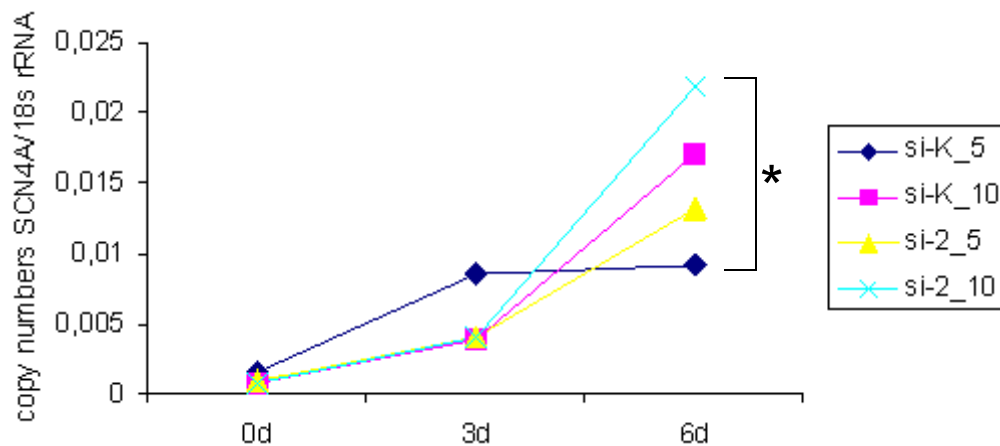
**Abb. 40:** Liniendiagramm (Fast Forward Protokoll) des Quotienten von RYR1 zum Housekeeping-Gen 18s, verglichen wurden 5 und 10 nM siRNA-2 gegen 5 und 10 nM Kontroll-siRNA zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d.

Der Vergleich von SCN4A zeigte bei der 10 nM Kontroll-siRNA eine deutlich höhere Konzentration im Vergleich zur siRNA-1. Die Unterschiede zwischen 5 und 10 nM Kontroll-siRNA zu 5 und 10 nM siRNA-1 waren statistisch nicht signifikant (Abb. 41).



**Abb. 41:** Liniendiagramm (Fast Forward Protokoll) des Quotienten von SCN4A zum Housekeeping-Gen 18s, verglichen wurden 5 und 10 nM siRNA-1 gegen 5 und 10 nM Kontroll-siRNA zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d. Dargestellt sind die Signifikanzen nach 6 d, \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$  nach Student's T-test.

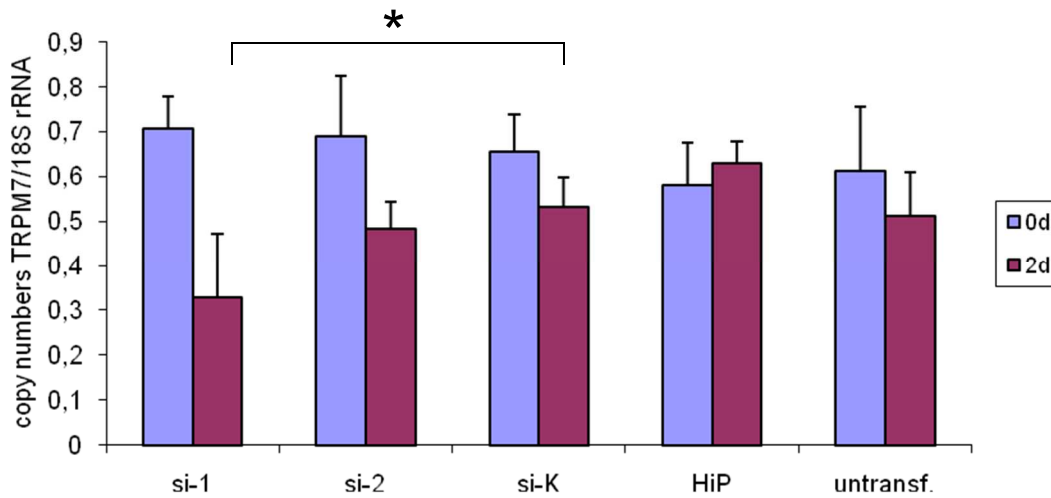
Der Vergleich von 10 nM siRNA-2 und 5 nM Kontroll-siRNA zeigte einen signifikanten Unterschied (\*  $p = 0,039$ ) bezüglich SCN4A. Der Marker war unter Kontroll-siRNA deutlich reduziert. Die anderen Zellen zeigten nach 6 d keinen signifikanten Unterschied bei SCN4A (Abb. 42).



**Abb. 42:** Liniendiagramm (Fast Forward Protokoll) des Quotienten von SCN4A zum Housekeeping-Gen 18s, aufgetragen wurden 5 und 10 nM siRNA-2 gegen 5 und 10 nM Kontroll-siRNA zu den Zeitpunkten 0 d, 3 d und 6 d. Dargestellt sind die Signifikanzen nach 6 d, \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$  nach Student's T-test.

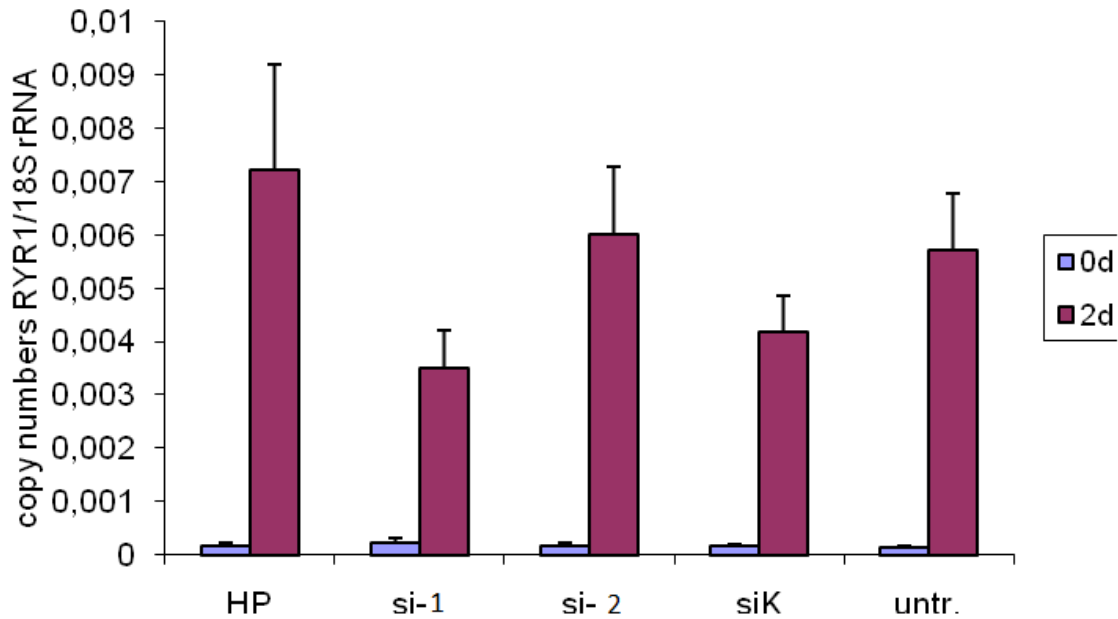
Es erfolgte eine weitere Differenzierungsstrecke nach dem Traditionellen Protokoll (Abb. 43). Hierbei erfolgte die Signifikanzbestimmung unter siRNA-1 und -2 jeweils

am 2. Tag. Unter siRNA-1 kam es zu einer signifikanten Reduktion (\*  $p=0,0295$ ) des TRPM7/18s-Quotienten im Vergleich zur Kontroll-siRNA.



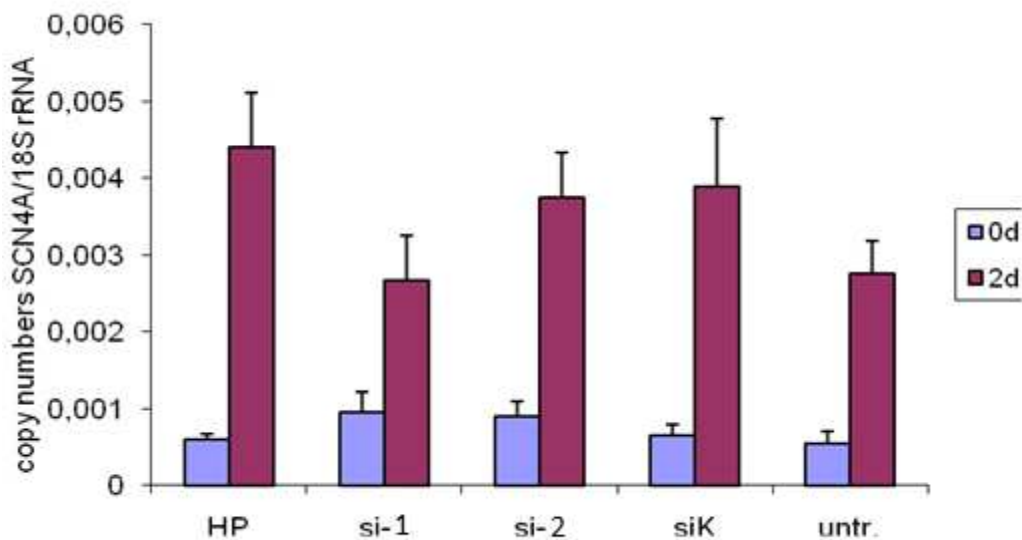
**Abb. 43:** Säulendiagramm (Traditionelles Protokoll) des Quotienten von TRPM7 zum Housekeeping-Gen 18s, verglichen wurden siRNA-1 und -2 gegen Kontroll-siRNA, HiPerFect behandelte Zellen und untransfizierte Zellen am 2. Tag der Differenzierungsstrecke. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,005$  nach Student's T-test.

Beim Vergleich des Ryanodinrezeptors mit 18s RNA am 2. Tag stellten sich keine signifikanten Unterschiede heraus, die Tendenz der geringeren Kopienanzahl von Ryanodin bei den siRNA-1 behandelten Zellen zeigte sich allerdings auch hier (Abb. 44).



**Abb. 44:** Säulendiagramm (Traditionelles Protokoll) des Quotienten von RYR1 zum Housekeeping-Gen 18s, verglichen wurden siRNA-1 und -2 gegen Kontroll-siRNA, HiPerFect behandelte Zellen und untransfizierte Zellen am 2. Tag der Differenzierungsstrecke. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\sigma$ ).

Auch bei SCN4A zeigte sich die gleiche Tendenz, dass siRNA-1 die größte Herunterregulierung der Differenzierung erreichte (Abb. 45).



**Abb. 45:** Säulendiagramm (Traditionelles Protokoll) des Quotienten von SCN4A zum Housekeeping-Gen 18s, verglichen wurden siRNA-1 und -2 gegen Kontroll-siRNA,

HiPerFect behandelte Zellen und untransfizierte Zellen am 2. Tag der Differenzierungsstrecke. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\tau$ ).

## **IV. Diskussion**

Zielstellung der Arbeit war die Untersuchung von Muskelzellen in ihrem Proliferations- und Differenzierungsverhalten nach TRPM7-Knockdown. Es erfolgte die Bestimmung der TRPM7-Expression nach siRNA-Transfektion auf RNA-Ebene. Zusätzlich wurde die Korrelation der TRPM7-Expression auf Proteinebene untersucht.

Die posttranskriptionale Geninaktivierung (post-transcriptional gene silencing, PTGS) durch siRNAs zeigte sich als Methode mit großem therapeutischen Potenzial und wurde 2001 von Elbashir et al. auf ihre Voraussetzungen hinsichtlich Länge, Struktur, chemische Zusammensetzung und Sequenz untersucht. Doppelte, 21 Nukleotide (nt) lange siRNAs mit 2 Nukleotiden Überhang am 3'-terminalen Ende stellten sich als effizientester Trigger für Sequenz-spezifische mRNA-Degradierung heraus (Elbashir et al., 2001). Das Erreichen der Zielgenstruktur wurde nachweislich durch das 5'-terminale Ende der siRNA definiert, Substitutionen am 3'-terminalen Ende wurden toleriert ohne Änderungen der programmierten siRNA (Elbashir et al., 2001).

Auf dieser Grundlage der vorangegangenen Etablierung des Genknockdowns durch siRNA wurden nachfolgende Untersuchungen durchgeführt.

Hierfür wurde zunächst die siRNA-Einschleusung in HEK293-Zellen durch Fluoreszenzmessung dokumentiert. Im Anschluss wurde der erfolgreiche TRPC6-Knockdown in HEK293-Zellen nach siRNA-Transfektion auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR nachgewiesen. Durch konfokale Lasermikroskopie zeigte sich immunhistochemisch die Ausschaltung der TRPC6-Kanäle. Die Korrelation des mRNA-Knockdowns fand sich per Westernblot auf Proteinebene gleichermaßen wieder. Nach Etablierung zweier Protokolle zur Transfektion (Fast Forward und Traditionelles Protokoll) wurden die beiden Methoden auf TRPM7-Kanäle in C57Bl-Zellen angewendet.

Hier zeigte sich 48 h nach Transfektion ein insgesamt reduzierter ATP-Gehalt der Zellen. Die Vitalität der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen sowie der HiPerFect behandelten Zellen war ebenfalls reduziert. Unter siRNA-1 und -2 kam es zu einer deutlichen Reduktion des ATP-Gehaltes. Hier zeigte sich keine Korrelation zwischen ATP-Gehalt und der verwendeten siRNA-Konzentration. Die weiteren Versuche wurden mit mittleren siRNA-Konzentrationen von 5 und 10 nM fortgesetzt. Die transfektionsbedingte eingeschränkte Überlebensfähigkeit der Zellen ließ sich

teilweise auf die verwendeten Reagenzien, insbesondere das HiPerFect, zurückführen. Eine Schädigung der Zellen durch den Transfektionsvorgang war hier ebenfalls denkbar. In vorangegangenen Studien zeigten sich keine vergleichbaren Ergebnisse, was auf eine hohe Empfindlichkeit der hier untersuchten Muskelzellen C57Bl rückschließen lässt.

Um die Aussagekraft der Methoden zu erhöhen erfolgte die Fortsetzung beider Protokolle (Fast Forward und Traditionelles Protokoll) um eine möglichst große Anzahl von vitalen Zellen auf ihren TRPM7-Gehalt nach Transfektion zu untersuchen. Zusätzlich wurde mit mehreren Kontrollgruppen (untransfizierte Zellen, Kontroll-siRNA transfizierte und HiPerFect-behandelte Zellen) gearbeitet, um den gezielten TRPM7-Knockdown zu quantifizieren. Das bedeutete, dass nur bei regelhaftem ATP-Gehalt eine reduzierte Menge von TRPM7 zu verwerten war. Beim Absterben der Zellen zeigte sich der TRPM7-Gehalt durch die fehlende Vitalität reduziert und bewies keinen Transfektionserfolg.

Die Untersuchung des ATP-Gehaltes auf Zeitabhängigkeit zeigte eine insgesamt deutlich verringerte Vitalität der C57Bl-Zellen mit zunehmendem Zeitraum nach Transfektion. Hierbei wurde das Traditionelle Protokoll verwendet.

Mittels Taqman wurde nach siRNA-Knockdown eine Quantifizierung von TRPM7 bezogen auf das Housekeeping Gen 18 s durchgeführt. Bei 50 nM siRNA-1 zeigte sich in Bezug auf die untransfizierten Zellen eine signifikante TRPM7-Reduktion.

Bei der Transfektion mit 10 nM siRNA-2 in Bezug auf die mit HiPerFect behandelten und die untransfizierten Zellen wurde die signifikante Reduktion bereits bei dieser geringeren Konzentration erzielt.

In der Untersuchung der Zeitabhängigkeit wurde bei den C57Bl-Zellen eine sehr signifikante Herunterregulierung von TRPM7 durch siRNA-1 und eine hochsignifikante durch siRNA-2 nach 72 h im Vergleich zu den untransfizierten Zellen nachgewiesen. Die Kontroll-siRNA zeigte sich nicht signifikant reduziert bezogen auf die untransfizierten Zellen. Unter siRNA-1 und -2 zeigte sich eine signifikante Reduktion im Vergleich mit der Kontroll-siRNA. Nach 96 h kam es zu keiner Zunahme der TRPM7-Reduktion.

Unter Verwendung des Fast-Forward Protokolls zeigte sich nach 24 h ebenfalls ein reduzierter ATP-Gehalt nach Transfektion im Vergleich zu den untransfizierten

Zellen. Der ATP-Gehalt der transfizierten Zellen zeigte einen nicht signifikanten Einbruch im Gegensatz zu den Untransfizierten nach 48 h.

Nach 24 h war bei der Taqman-Quantifizierung bezogen auf das Housekeeping-Gen 18 s eine signifikante TRPM7-Reduktion unter siRNA-1 im Vergleich mit den untransfizierten Zellen zu verzeichnen. Bei der TRPM7-Quantifizierung zeigte sich nach 48 h eine Herunterregulation unter siRNA-2 mit deutlicher Signifikanz verglichen mit der Kontroll-siRNA. Unter siRNA-1 zeigte sich auch hier eine deutliche, aber nicht signifikante TRPM7-Reduktion.

Immunhistochemisch konnte, wie auch in den Vorversuchen mit TRPC6, ein deutlicher TRPM7-Knockdown durch beide siRNAs in den Membranen im Vergleich zur Kontroll-siRNA und den untransfizierten C57BI-Zellen nach 24 und 48 h nachgewiesen werden.

Mit Hilfe des Western Blots zeigte sich auf Proteinebene nach siRNA-2 Transfektion die deutliche TRPM7 Reduktion in C57BI-Zellen. Hier wurde zur TRPM7-Bestimmung ein Quotient aus TRPM7 und dem Strukturprotein F-Aktin gebildet. Das Ergebnis zeigte keine Proportionalität zur verwendeten siRNA-Konzentration.

Die Differenzierungsstrecke der C57BI-Zellen wurde zu Beginn mittels mikroskopischen Fotos von Tag 0 bis 6 dokumentiert. Es wurde mit 5 nM (37,5 ng) siRNA nach dem Fast Forward Protokoll transfiziert. Es zeigte sich eine deutlich bessere Differenzierung und Proliferation bei den untransfizierten C57BI-Zellen. Nach 24 h waren hier spindelförmige Myoblasten sichtbar und nach 48 h konnte man die Teilung und Parallelisierung der Myoblasten beobachten.

Die Differenzierung der siRNA transfizierten Zellen zeigte sich mikroskopisch deutlich eingeschränkt. Zusätzlich zum Proliferationsstillstand kam es bei einigen Zellen zum Absterben.

Bei der anschließenden Differenzierungsstrecke wurde mit zwei Konzentrationen siRNA (5 und 10 nM) und dem Fast Forward Protokoll gearbeitet. Im Zentrum der Untersuchung stand die Quantifizierung von TRPM7 und der Marker für Muskeldifferenzierung Ryanodinrezeptor 1 und SCN4A.

Das SCN4A-Gen kodiert für die  $\alpha$ -Untereinheit des muskulären, spannungsabhängigen Natriumkanals Nav1.4. Dieser Natriumkanal ist für die Initiierung und Ausbreitung von Aktionspotenzialen in den Muskelfasern verantwortlich, was eine Muskelkontraktion zur Folge hat (Corrochano et al., 2014).

Die Ryanodinrezeptoren sind die größten bekannten Ionenkanäle (Lanner et al., 2010; Takeshima et al., 1989; Nakai et al., 1990; Otsu et al., 1990; Zorzato et al., 1990; Hakamata et al., 1992) und durch ihre hohe Leitfähigkeit in der Lage einen schnellen zytosolischen Calciumanstieg herbeizuführen (Lanner et al., 2010; Smith et al., 1985; Smith et al., 1986). Der Ryanodinrezeptor 1 ist überwiegend in der Skelettmuskulatur exprimiert (Lanner et al., 2010; Takeshima et al., 1989; Zorzato et al., 1990).

Als Referenzgen wurde das Housekeeping-Gen 18s verwendet und mit den Differenzierungsmarkern ein Quotient gebildet. Zu erwarten war hier eine quantitative Vermehrung der Differenzierungsmarker bei fortschreitender Muskeldifferenzierung.

Im Anschluss wurden die jeweiligen Signifikanzen nach 6 Tagen ermittelt.

Zusammenfassend zeigten sich bei Differenzierung unter Kontroll-siRNA folgende Auffälligkeiten: Die Entwicklung der Zellen war nach Transfektion erheblich eingeschränkt. Das ließ sich am insgesamt reduzierten Gehalt von TRPM7, Ryanodinrezeptor 1 und SCN4A feststellen. Dieses Ergebnis ließ sich nicht nur bei den siRNA-transfizierten Zellen, sondern bereits bei Einsatz des HiPerFectes ohne zusätzliche siRNA erkennen. Die untransfizierten Zellen differenzierten – wie erwartet – am besten. Die Differenzierung der transfizierten Zellen war nicht abhängig von der Menge der verwendeten siRNA.

Darauf folgend wurde das Differenzierungsverhalten unter siRNA-1 Transfektion in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Beim Vergleich der 5 und 10 nM siRNA-1 mit den untransfizierten Zellen zeigte sich ein deutliche aber nicht signifikante Reduktion von TRPM7 auf RNA-Ebene. Auch der Ryanodinrezeptor 1 erwies sich am 6. Tag bei 5 und 10 nM siRNA-1 transfizierten Zellen im Vergleich zu den Untransfizierten ebenfalls als nicht signifikant reduziert. Das HiPerFect schränkte auch hier die Differenzierungsfähigkeit der Zellen ein. Bei dem zweiten Differenzierungsmarker SCN4A kam es zu einer signifikanten Reduktion unter 5 nM siRNA-1 und 10 nM siRNA-1 im Vergleich zu den untransfizierten Zellen. Die mit HiPerFect behandelten Zellen waren in ihrer Differenzierung signifikant eingeschränkt.

Zum Vergleich wurden die C57BI-Zellen mit der siRNA-2 transfiziert. Hierbei zeigte sich eine nicht eindeutige TRPM7-Reduktion unter 5 nM siRNA-2 bezogen auf die untransfizierten Zellen. Die höhere siRNA-Konzentration verzeichnete keinen Erfolg.

Der deutliche Abfall vom Gehalt des Ryanodinrezeptors 1 unter 5 nM und 10 nM siRNA-2 war nicht signifikant. Die Quantität von SCN4A war nicht signifikant herunterreguliert unter siRNA-2 Transfektion.

Die Unterschiede zwischen den siRNA-1 und -2 transfizierten Zellen mit der Kontroll-siRNA zeigten beim Vergleich des TRPM7/18s-Quotienten folgende Ergebnisse: Unter siRNA-1 zeigte sich eine signifikante Reduktion von TRPM7 bei einer Konzentration von 10 nM im Vergleich mit der Kontroll-siRNA (10 nM).

Unter siRNA-2 Transfektion kam es zu keinem erfolgreichen TRPM7-Knockdown.

Beim Vergleich des Ryanodinrezeptors 1 kam es unter beiden siRNAs zu einer deutlichen aber nicht signifikanten Reduzierung des Rezeptors in den C57Bl-Zellen im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Der Differenzierungsmarker SCN4A zeigte bei der 10 nM Kontroll-siRNA eine deutlich höhere Konzentration im Vergleich zur siRNA-1.

Unter siRNA-2 kam es zu keiner erfolgreichen Reduktion von SCN4A.

Es erfolgte eine weitere Differenzierungsstrecke nach dem Traditionellen Protokoll. Hierbei erfolgte die Signifikanzbestimmung jeweils am 2. Tag. Der Vergleich mit der Kontroll-siRNA zeigte eine signifikante Reduktion des TRPM7/18s Quotienten unter siRNA-1.

Beim Vergleich des Ryanodingehaltes am 2. Tag stellten sich keine signifikanten Unterschiede heraus, die Tendenz der geringen Kopienanzahl unter siRNA-1 behandelten Zellen zeigte sich allerdings auch hier. Auch bei SCN4A zeigte sich die Tendenz, dass siRNA-1 die größte Herunterregulierung am 2. Tag erreichte.

Die eingeschränkte Transfizierbarkeit von C57Bl-Zellen zeigte sich als der limitierender Faktor dieser Methode und erschwerte die Interpretation der Ergebnisse.

Unter siRNA-1 konnte eine ausbleibende Proliferation und Differenzierung der Muskelzellen bis hin zum Zelltod nachgewiesen werden. Als Ursache ist neben der gestörten Magnesium-/ Calciumhomöostase resultierend aus dem TRPM7-Knockdown auch eine Schädigung der Zellen durch den Transfektionsvorgang denkbar.

Unter siRNA-2 Transfektion waren die Ergebnisse aufgrund der deutlich reduzierten Vitalität nach Transfektion nicht aussagekräftig.

In verschiedenen Geweben konnte in Studien das Proliferations- und Differenzierungsverhalten bereits gezeigt werden. Chen et al. zeigten 2014 den TRPM7-Einfluß in Präadipozyten bei der Adipogenese und Zellproliferation. Hier erfolgte der Knockdown von TRPM7 mit 2-APB und siRNA (Chen et al., 2014).

2-APB etablierte sich als Inhibitor von  $IP_3$  und effektiver Inhibitor von store-operated calcium channels (SOC) (Bootman et al., 2002). Zusätzlich konnte durch 2-APB die Funktion verschiedener TRP-Kanäle modifiziert werden und nachfolgend Aussagen zur Kanalfunktion getroffen werden (Xu et al., 2005).

In glatten Gefäßmuskelzellen (Vascular smooth muscle cells: VSMCs) zeigten He et al., 2005, dass Angiotensin II und Aldosteron nicht nur den Gefäßtonus und die Gefäßstruktur beeinflussen, sondern auch die Anzahl von TRPM7-Kanälen. AT II und Aldosteron stimulierten Transkriptionsfaktoren, die an der TRPM-Produktion beteiligt waren (He et al., 2005). Durch die Funktion der  $Mg^{2+}$ -Homöostase wurde dem TRPM7-Kanal eine essentielle Funktion in den Gefäßen der glatten Muskulatur zugeordnet (He et al., 2005).

Nicht nur physiologische Zellproliferation zeigten sich von TRPM7 abhängig, ebenfalls in Tumorgewebe zeigten Jiang et al. 2008 die Rolle der TRPM7-Kanäle bei Plattenepithelkarzinomen (SCC-25 Zellen) in Kopf- und Halsarealen. Die SCC-25 Tumorzellen konnten hier durch siRNA gegen TRPM7 und 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) in ihrem Wachstum und in ihrer Proliferation gehindert werden (Jiang et al., 2008).

Eine weitere Rolle wurde dem Kanal bei der Proliferation des humanen Retinoblastoms zugeschrieben (Hanano et al., 2004): Nach TRPM7 silencing kam es durch den reduzierten  $Ca^{2+}$ -Einstrom zu einer abnehmenden Zellproliferation (Hanano et al., 2004).

Ein widersprüchliches Ergebnis erzielte eine Studie von Inoue und Xiong 2009: Nach TRPM7-Knockdown durch siRNA in humanen Endothelzellen der Nabelvenen (HUVECs) kam es zu einer vermehrten Phosphorylierung der extrazellulären Signalregulierten Kinase (ERK), was das Wachstum und die Proliferation von HUVECs trotz TRPM7-Knockdown anregte (Inoue und Xiong, 2009). Dieses Zellverhalten bezog sich ausschließlich auf HUVECs.

Auch in mesenchymalen Stammzellen zeigte sich TRPM7 mit einer Schlüsselrolle in der Osteogenese durch Mechanotransduction (Xiao et al., 2015).

Die erfolgreiche Genausschaltung durch siRNA-Transfektion bewährte sich in vielen Arbeiten. Der Knockdown durch 2-APB zeigte sich ebenfalls erfolgreich.

In dieser Arbeit zeigten sich die HEK293-Zellen als deutlich stabiler bei der Transfektion als die C57BI-Zellen. Bei den untersuchten Muskelzellen C57BI kam es wiederholt zu Einbrüchen des ATP-Gehaltes und zum Absterben der Zellen. Je vulnerabler die zu untersuchende Zellart, umso schwieriger war hierbei eine zuverlässige Aussage zum Kanal-Knockdown. 2-APB wurde in dieser Arbeit nicht zum Knockdown verwendet.

Die Relevanz des TRPM7-Kanals bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen konnte bereits in vielen Arbeiten nachgewiesen werden.

Als Ausblick sind langfristig pharmakologische Therapien in Bezug auf Tumorbehandlung möglich durch Verwendung von siRNA. Ning et al. untersuchten 2014 die Zellen bei einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC). Es zeigte sich eine Überexpression der Micro-RNA miR-182, welche eine mögliche Chemoresistenz gegen Cisplatin verursachte. Der Pathomechanismus der Micro-RNA war die Herunterregulierung eines Proteins (programmed cell death 4 (PDCD4) protein), was für den programmierten Zelltod der Tumorzellen verantwortlich war (Ning et al., 2014). Auch Barik und Lu zeigten 2014 die antivirale Wirkung von siRNA bei Infektionen des Respirationstraktes.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein erfolgreicher TRPC6-Knockdown in HEK293-Zellen durch siRNA-Transfektion nach zwei Protokollen nachgewiesen werden. Bei der anschließenden Transfektion der C57BI-Zellen kam es zu einem erfolgreichen TRPM7-Knockdown unter siRNA-1. Bei der Differenzierungsstrecke der Muskelzellen zeigte sich eine verminderte Proliferation und Differenzierung bis hin zum Zelltod unter siRNA-1 Transfektion. Das könnte auf eine Abhängigkeit der Entwicklungsfähigkeit der Muskelzellen von den TRPM7-Kanälen hinweisen. Einflüsse der Transfektion selbst können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die weitere Erforschung der TRP-Kanäle zur Klärung möglicher therapeutischer Ansätze ist vielversprechend, da die klinische Relevanz der TRP-Kanäle in zahlreichen vorausgegangenen Arbeiten nachgewiesen wurde.

## **V. Zusammenfassung**

Der TRPM7-Kanal ist ubiquitär exprimiert (Montell et al., 2005) und an multiplen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt (Monteilh-Zoller et al., 2003). Durch TRPM7-Knockdown mittels siRNA wurde in dieser Arbeit versucht, die Bedeutung des Ionenkanals für die Differenzierungsfähigkeit von kultivierten Muskelzellen zu untersuchen.

In Vorversuchen erfolgte die Etablierung der siRNA-Transfektionstechnik mit HEK293-Zellen nach zwei unterschiedlichen Protokollen. Zunächst konnte der TRPC6-Knockdown an TRPC6 überexprimierenden HEK293-Zellen gezeigt werden. Das Vorgehen wurde anschließend auf den zu untersuchenden Kanal TRPM7 in C57BI-Zellen übertragen. Dazu musste die Methodik wiederholt abgewandelt werden, um möglichst viele vitale und transfizierte Zellen zu erhalten. Als Kontrollen dienten untransfizierte Zellen, mit unspezifischer siRNA-transfizierte Zellen und mit HiPerFect, dem Transfektionsreagenz, behandelte Zellen. Letztendlich konnte eine ausreichende Anzahl der transfizierten Zellen bezüglich ihrer Proliferation und Differenzierung anhand von zwei Differenzierungsmarkern, dem Ryanodinrezeptor 1 und dem SCN4A, untersucht werden. Dabei zeigten sich die folgenden Ergebnisse: Ein bis zwei Tage nach der Transfektion mit spezifischer siRNA zeigte sich eine verminderte Expression des TRPM7 in Muskelzellkulturen von ca. 50% im Vergleich zu den Kontrollen. Die Differenzierung der siRNA-transfizierten Zellen zeigte sich mikroskopisch deutlich eingeschränkt. Die Hemmung der TRPM7-Expression verlangsamte die Proliferation und Differenzierung der kultivierten Muskelzellen. Die beschriebenen Auswirkungen ließen sich aber nicht nur bei den siRNA-transfizierten Zellen, sondern teilweise auch bei Einsatz des HiPerFectes ohne zusätzliche siRNA erkennen. Die untransfizierten Zellen differenzierten – wie erwartet – am besten. Die Differenzierung der transfizierten Zellen war nicht abhängig von der Menge der siRNA. Die muskelspezifischen Marker, der Ryanodinrezeptor 1 und der spannungsgesteuerte Na<sup>+</sup>-Kanal SCN4A, waren nach siRNA-Anwendung gegen den TRPM7 tendenziell vermindert. Es zeigte sich jedoch auch eine Reduktion der Differenzierungsmarker in den transfizierten Kontrollgruppen. Zusammenfassend scheint der TRPM7 für Zellproliferation und Differenzierung von Muskelzellen relevant zu sein. Die C57BI-Zellen reagierten allerdings recht sensitiv auf Transfektionen, so dass diesbezüglich nur eine eingeschränkte Aussage getroffen werden kann. Wegen seiner ubiquitären Expression, seiner Beteiligung an diversen

physiologischen und pathophysiologischen Prozessen und seiner bedeutenden Rolle für die  $Mg^{2+}$ -Homöostase bleibt der TRPM7 ein höchst interessanter und relevanter Ionenkanal.

## **VI. Literaturverzeichnis**

- M.M. Aarts, M. Tymianski, “**TRPMs and neuronal cell death**”, *European Journal of Physiology*, © Springer-Verlag 2005, 10.1007/s00424-005-1439-x
- S. Asrar, M. Aarts, “**TRPM7, the cytoskeleton and neuronal death**”, *Channels (Austin)*, 2013 Jan 1;7(1):6-16. doi: 10.4161/chan.22824. Epub 2012 Dec 17
- S. Barik, P. Lu, “**Therapy of Respiratory Viral Infections with Intranasal siRNAs**”, *RNA Interference, Methods in Molecular Biology Volume 1218*, 2015, pp 251-262, ©Springer
- M.J. Berridge, M.D. Bootman, P. Lipp, “**Calcium – a life and death signal**”, *Nature* ©
- S. Boisseau, C. Kunert-Keil, S. Lucke, A. Bouron, “**Heterogeneous distribution of TRPC proteins in the embryonic Cortex**”, *Histochem Cell Biol* (2009) 131:355–363, DOI 10.1007/s00418-008-0532-6
- M.D. Bootman, T.J. Collins, L. Mackenzie, H.L. Roderick, M.J. Berridge, C.M. Peppiatt, “**2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry but an inconsistent inhibitor of InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release**”, *FASEB J.* 2002 Aug;16(10):1145-50
- K.H. Chen, X.H. Xu, Y. Liu, Y. Hu, M.W. Jin, G.R. Li, “**TRPM7 channels regulate proliferation and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes**”, *J Cell Physiol.* 2014 Jan;229(1):60-7. doi: 10.1002/jcp.24417
- D.E. Clapham, “**TRP channels as cellular sensors**”, *Nature* 426, 517-524, 2003, doi: 10.1038/nature02196
- K. Clark, M. Langeslag, B. van Leeuwen, L. Ran, A.G. Ryazanov, C.G. Figdor, W.H. Moolenaar, K. Jalink, F.N. van Leeuwen, “**TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion**”, *EMBO J* 2006; 25: 290–301
- K. Clark, J. Middelbeek, E. Lasonder, N.G. Dulyaninova, N.A. Morrice, A.G. Ryazanov et al., “**TRPM7 regulates myosin IIA filament stability and protein localization by heavy chain phosphorylation**”, *Journal of Molecular Biology* 2008, 378: 790-803
- S. Corrochano, R. Männikkö, P.I. Joyce, P. McGoldrick, J. Wettstein, G. Lassi, D.L. Raja Rayan, G. Blanco, C. Quinn, A. Liavas, A. Lionikas, N. Amior, J. Dick, E.G. Healy, M. Stewart, S. Carter, M. Hutchinson, L. Bentley, P. Fratta, A. Cortese, R. Cox, S.D.M. Brown, V. Tucci, H. Wackerhage, A.A. Amato, L. Greensmith, M. Koltzenburg, M.G. Hanna, A. Acevedo-Arozena, “**Novel mutations in human and mouse SCN4A implicate AMPK in myotonia and**

- periodic paralysis**", *Brain*. 2014 Dec; 137(12): 3171–3185, Published online 2014 Oct 20. doi: 10.1093/brain/awu292
- M.V. Dorovkov, A.G. Ryazanov, "**Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase**", *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279:50643-6
  - A. Dietrich, T. Gudermann, "**TRPC6: Physiological Function and Pathophysiological Relevance**", *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels, Handbook of Experimental Pharmacology Volume 222*, 2014, pp157-188
  - S.M. Elbashir, J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, T. Tuschl, "**Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate**", *The EMBO Journal*, Vol. 20 No. 23 pp. 6877-6888, 2001
  - A. Guilbert, M. Gautier, I. Dhennin-Duthille, N. Haren, H. Sevestre, H. Ouadid-Ahidouch, "**Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation**", *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C493–C502, 2009
  - Y. Hakamata, J. Nakai, H. Takeshima, K. Imoto, "**Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain**", *FEBS Lett* 312:229–235 (1992)
  - T. Hanano, Y. Hara, J. Shi, H. Morita, C. Umebayashi, E. Mori, H. Sumimoto, Y. Ito, Y. Mori, R. Inoue, "**Involvement of TRPM7 in Cell Growth as a Spontaneously Activated Ca<sup>2+</sup> Entry Pathway in Human Retinoblastoma Cells**", *J Pharmacol Sci* 95, 403 – 419 (2004)
  - Y. He, G. Yao, C. Savoia, R.M. Touyz, "**Transient Receptor Potential Melastatin 7 Ion Channels regulate Magnesium Homeostasis in Vascular Smooth Muscle Cells: Role of Angiotensin II**", *Circ Res*. 2005 Feb 4;96(2):207-15. Epub 2004 Dec 9
  - M.C. Hermosura, M.K. Monteilh-Zoller, A.M. Scharenberg, R. Penner, A. Feig, "**Dissociation of the store-operated calcium current I<sub>CRAC</sub> and the Mg-nucleotide-regulated metal ion current MagNuM**", *J. Physiol*. 539:445-458, 2002
  - T. Hofmann, A.G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann, G. Schultz, "**Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol**", *Nature* 397, 259–263 (21. Januar 1999), doi:10.1038/16711
  - R. Inoue, L.J. Jensen, J. Shi, H. Morita, M. Nishida, A. Honda, Y. Ito, "**Transient Receptor Potential Channels in Cardiovascular Function and Disease**", *Circulation Research* 2006; 99:119-131

- K. Inoue, Z.-G. Xiong, “**Silencing TRPM7 promotes growth/proliferation and nitric oxide production of vascular endothelial cells via the ERK pathway**”, *Cardiovascular Research* (2009) 83, 547–557, doi:10.1093/cvr/cvp153
- J. Jiang, W.B. Lei, J.B. Shi, Z.Z. Su, Z.G. Xiong, “**Transient receptor potential melastatin 7 channel protein in human head and neck carcinoma cells and role in cell proliferation**”, *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2008 Jun;43(6):451-5, Chinese
- J. Jiang, M. Li, L. Yue, “**Potentiation of TRPM7 inward currents by protons**”, *J Gen Physiol.* 08/2005; 126 (2):137–50, Epub 2005 Jul 11
- G. Krapivinsky, S. Mochida, L. Krapivinsky, S.M. Cibulsky, D.E. Clapham, “**The TRPM7 Ion Channel Functions in Cholinergic Synaptic Vesicles and Affects Transmitter Release**”, *Neuron* 52, 485-496, © 2006 Elsevier Inc., DOI 10.1016/j.neuron.2006.09.033
- C. Kunert-Keil, F. Bisping, J. Krüger, H. Brinkmeier, “**Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains**”, *BMC Genomics* 2006, 7:159, doi:10.1186/1471-2164-7-159
- J. Krüger, C. Kunert-Keil, F. Bisping, H. Brinkmeier, “**Transient receptor potential cation channels in normal and dystrophic mdx muscle**“, *ScienceDirect – Neuromuscular Disorders*, Volume 18, Issue 6, June 2008, Pages 501-513, doi:10.1016/j.nmd.2008.04.003, © 2008 Elsevier B.V.
- J.T. Lanner, D.K. Georgiou, A.D. Joshi, S.L. Hamilton, “**Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release**”, Copyright © 2010 Cold Spring Harb Perspect Biol 2010;2:a003996
- A. Lis, U. Wissenbach, S.E. Philipps, “**Transcriptional regulation and processing increase the functional variability of TRPM channels**”, *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch Pharmacol* (2005) 371: 315-324, DOI 10.1007/s00210-005-1050-x, ©Springer-Verlag 2005
- H.S. Li, X.Z. Xu, C. Montell, “**Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF**”, *Neuron* 24:261–273, 1999
- M.K. Monteilh-Zoller, M.C. Hermosura, M.J.S. Nadler, A.M. Scharenberg, R. Penner, A. Fleig, “**TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions**”, *The Journal of General Physiology*, © The Rockefeller University Press, 0022-1295/2003/01/49/12, Volume 121, 49–60 (January 2003)

- C. Montell, 1, **“The TRP Superfamily of Cation Channels”**, *Science’s stke* 2005/272/re3
- C. Montell, 2, **“TRP Channels in Drosophila photoreceptor cells”**, *J Physiol* 567.1 (2005) pp 45–51
- C. Montell, K. Jones, E. Hafen, G. Rubin, **“Rescue of the Drosophila phototransduction mutation trp by germline transformation”**, *Science*. 1985 Nov 29;230(4729):1040-3.
- M.M. Moran, M.A. McAlexander, T. Bíró, A. Szallasi, **“Transient receptor potential channels as therapeutic targets“**, *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 601-620 (August 2011), doi:10.1038/nrd3456
- M.J. Nadler, M.C. Hermosura, K. Inabe, A.L. Perraud, Q. Zhu, A.J. Stokes, T. Kurosaki, J.P. Kinet, R. Penner, A.M. Scharenberg, A. Feig, **“LTRPC7 is a Mg-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability”**, *Nature*, 411:590-595, 2001
- J. Nakai, T. Imagawa, Y. Hakamata, M. Shigekawa, H. Takeshima, S. Numa, **“Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel”**, *FEBS letters* 271: 169–177 (1990)
- F.-I. Ning, F. Wang, M.-I. Li, Z.-s. Yu, Y.-z. Hao, S.-s. Chen, **“MicroRNA-182 modulates chemosensitivity of human non-small cell lung cancer to cisplatin by targeting PDCD4”**, *Diagn Pathol*. 2014 Jul 10;9:143. doi: 10.1186/1746-1596-9-143
- B. Nilius und T. Voets, **„The puzzle of TRPV4 channelopathies“**, *EMBO Rep*. 2013 Feb; 14(2):152-63.doi: 10.1038/embor.2012.219.
- K. Otsu, H.F. Willard, V.K. Khanna, F. Zorzato, N.M. Green, D.H. MacLennan, **“Molecular cloning of cDNA encoding the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum”**, *J Biol Chem* 265: 13472–13483(1990)
- T.M. Paravicini, V. Chubanov, T. Gudermann, **“TRPM7: a unique channel involved in magnesium homeostasis”**, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Volume 44, Issue 8, August 2012, Pages 1381–1384, doi:10.1016/j.biocel.2012.05.010, Epub 2012 May 24.*
- H.S. Park, C. Hong, B.J. Kim, I. So, **“The Pathophysiologic Roles of TRPM7 Channel”**, *Korean J Physiol Pharmacol, VOI 18: 15-23, 2014*
- A.F. Pla, D. Maric, S.C. Brazer, P. Giacobini, X. Liu, Y.H. Chang, I.S. Ambudkar, J.L. Barker, **“Canonical transient receptor potential plays a role in basic fibroblast growth factor (bFGF)/FGF receptor-1-induced Ca<sup>2+</sup> entry and embryonic rat neural stem cell proliferation”**, *J Neurosci* 25:2687–270, 2005

- L.W. Runnels, L. Yue, D.E. Clapham, **“The TRPM7 channel is inactivated by PIP<sub>2</sub> hydrolysis”**, *Nat Cell Biol. May 2002; 4 (5):329–36*
- K.P. Schlingmann, S. Weber, M. Peters, N.L. Niemann, H. Vitzthum, K. Klingel, M. Kratz, E. Haddad, E. Ristoff, D. Dinour, M. Syrrou, S. Nielsen, M. Sassen, S. Waldegger, H.W. Seyberth, M. Konrad, **“Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family”**, *Nat Genet 31:166-170, 2002*
- C. Schmitz, A.-L. Perraud, C.O. Johnson, K. Inabe, M.K. Smith, R. Penner, T. Kurosaki, A. Fleig, **“Regulation of Vertebrate Cellular Mg<sup>2+</sup> Homeostasis by TRPM7”**, *Cell, Vol. 114,191-200, © 2003 by Cell Press*
- J.S. Smith, R. Coronado, G. Meissner, **“Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide-activated calcium channels”**, *Nature 316: 446–449, (1985)*
- J. Smith, R. Coronado, G. Meissner, **“Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca<sup>2+</sup> and ATP and modulation by Mg<sup>2+</sup>”**, *J Gen Physiol 88: 573–588, (1986)*
- P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, **“Measurement of protein using bicinchoninic acid”**, *Anal Biochem 1985;150(1):76-85, Erratum: Anal Biochem 1987; 163(1):279*
- K. Sossey-Alaoui, J.A. Lyon, L. Jones, F.E. Abidi, A.J. Hartung, B. Hane, C.E. Schwartz, R.E. Stevenson, A.K. Srivastava, **“Molecular cloning and characterization of TRPC5 (HTRP5), the human homologue of a mouse brain receptor-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry channel”**, *Genomics 60:330–340, 1999*
- L.T. Su, M.A. Agapito, M. Li, W.T. Simonson, A. Huttenlocher, R. Habas, L. Yue, L.W. Runnels, **“TRPM7 regulates cell adhesion by controlling the calcium dependent protease calpain”**, *J Biol Chem 2006; 281 (16):11260-70*
- H. Takeshima, S. Nishimura, T. Matsumoto, H. Ishida, K. Kangawa, N. Minamino, H. Matsuo, M. Ueda, M. Hanaoka, T. Hirose et al., **“Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor”**, *Nature 339: 439–445, (1989)*
- K. Venkatachalam and C. Montell, **“TRP Channels”**, *NIH Public Access, Annu Rev Biochem. 2007 ; 76: 387–417. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819*

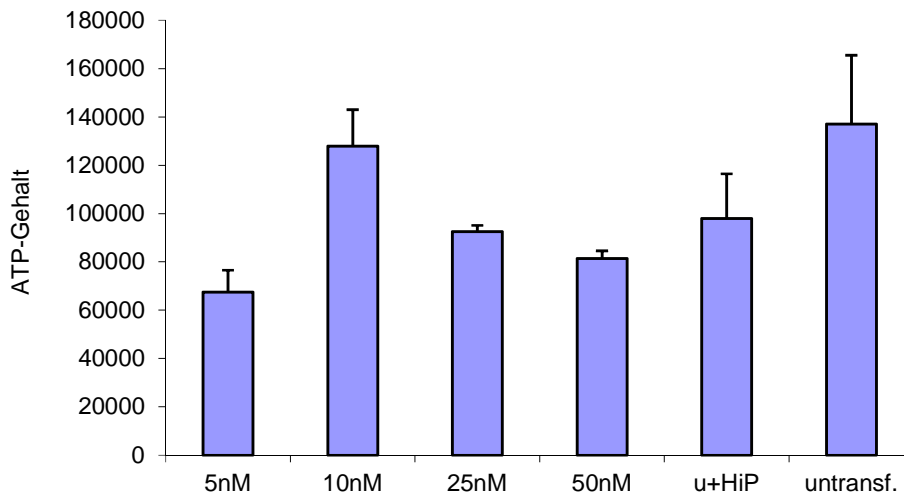
- T. Voets, B. Nilius, S. Hoefs, A.W. van der Kemp, G. Droogmans, R.J. Bindels, J.G. Hoenderop, "**TRPM6 forms the Mg<sup>2+</sup> influx channel involved in intestinal and renal Mg<sup>2+</sup> absorption**", *J. Biol. Chem.* 279, 19–25 (2004)
- R.Y. Walder, D. Landau, P. Meyer, H. Shalev, M. Tsolia, Z. Borochowitz, M.B. Boettger, G.E. Beck, R.K. Englehardt, R. Carmi, V.C. Sheffield, "**Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia**", *Nat Genet* 31:171-174 (2002)
- P.D. Wes, J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten, C. Montell, "**TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel**", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9652-9656 (1995)
- E. Xiao, H.Q. Yang, Y.H. Gan, D.H. Duan, L.H. He, Y. Guo, S.Q. Wang, Y. Zhang, "**Brief reports: TRPM7 Senses mechanical stimulation inducing osteogenesis in human bone marrow mesenchymal stem cells**", *Stem Cells.* 2015 Feb;33(2):615-21. doi: 10.1002/stem.1858
- S.-Z. Xu, F. Zeng, G. Boulay, C. Grimm, C. Harteneck, D.J. Beech, "**Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect**", *British Journal of Pharmacology* (2005) 145, 405–414 ©2005 Nature Publishing Group, 0007–1188/05
- N.S. Yee, A.A. Kazi, R.K. Yee, "**Cellular and Developmental Biology of TRPM7 Channel-Kinase: Implicated Roles in Cancer**", *Cells* 2014, 3, 751-777; doi:10.3390/cells3030751
- A. Yogi, G.E. Callera, T.T. Antunes, R.C. Tostes, R.M. Touyz, "**Transient Receptor Potential Melastatin 7 (TRPM7) Cation Channels, Magnesium and the Vascular System in Hypertension**", *Circulation Journal, Vol. 75: 237-245, February 2011*
- Y. Yu, I. Fantozzi, C.V. Remillard, J.W. Landsberg, N. Kunichika, O. Platoshyn, D.D. Tigno, P.A. Thistlethwaite, L.J. Rubin, J.X. Yuan, "**Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension**", *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 13861-13866
- D. Yue, Y. Wang, J.-Y. Xiao, P. Wang, C.-S. Ren, "**Expression of TRPC6 in benign and malignant human prostate tissues**", *Asian Journal of Andrology* (2009) 11: 541–547
- F. Zorzato, J. Fujii, K. Otsu, M. Phillips, N.M. Green, F.A. Lai, G. Meissner, D.H. MacLennan, "**Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca<sup>2+</sup> release**

**channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum", *J Biol Chem* 265: 2244–2256, (1990)**

## VII. Anhang

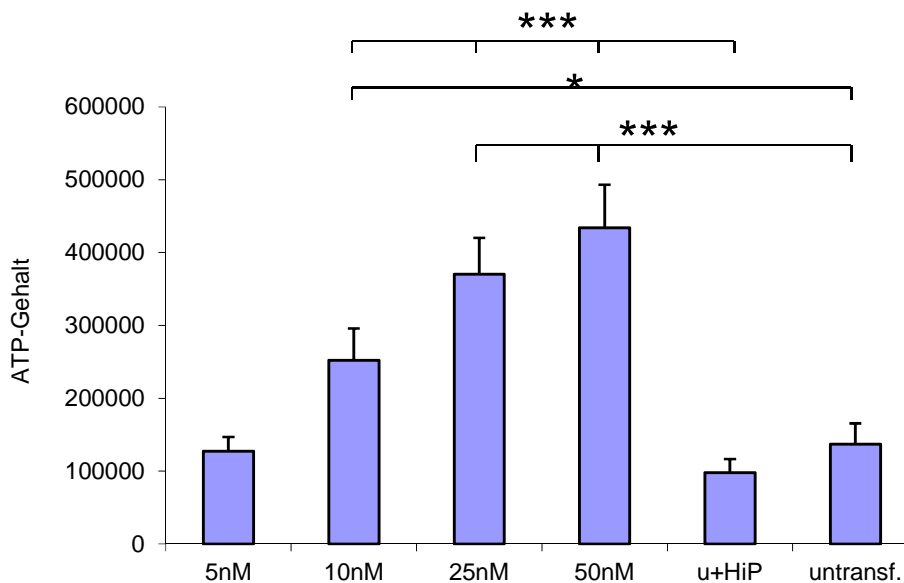
### Zu 3.2.1.1. Konzentrationsabhängigkeit, ATP-Diagramme zu Tabelle 1

#### siRNA-1



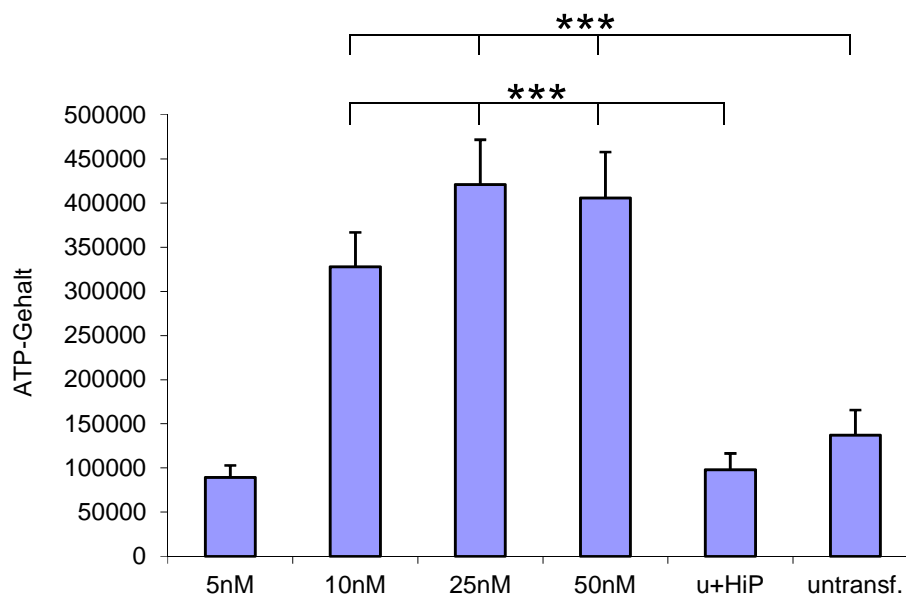
**Abb. 46 zu Tab. 1:** Das Säulendiagramm enthält n=16-28 Einzelergebnisse aus 2-4 unabhängigen Transfektionen. Zur Darstellung des ATP-Gehaltes (in nM) nach siRNA-1 Transfektion (Traditionelles Protokoll) nach 48 h für verschiedene siRNA-1 Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  nach Student's T-test.

#### siRNA-2



**Abb. 47 zu Tab. 1:** Das Säulendiagramm enthält n=24-30 Einzelergebnisse aus 4 unabhängigen Transfektionen. Zur Darstellung des ATP-Gehaltes (in nM) nach siRNA-2 Transfektion (Traditionelles Protokoll) nach 48 h für verschiedene siRNA-2-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  nach Student's T-test.

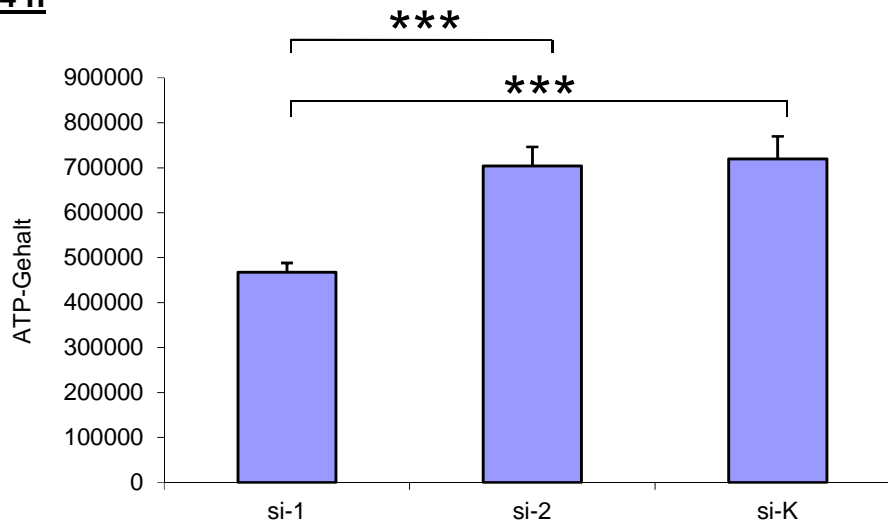
### siRNA-K



**Abb. 48 zu Tab. 1:** Das Säulendiagramm enthält n=24-30 Einzelergebnisse aus 4 unabhängigen Transfektionen. Zur Darstellung des ATP-Gehaltes (in nM) nach siRNA-K Transfektion (Traditionelles Protokoll) nach 48 h für verschiedene siRNA-K-Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  nach Student's T-test.

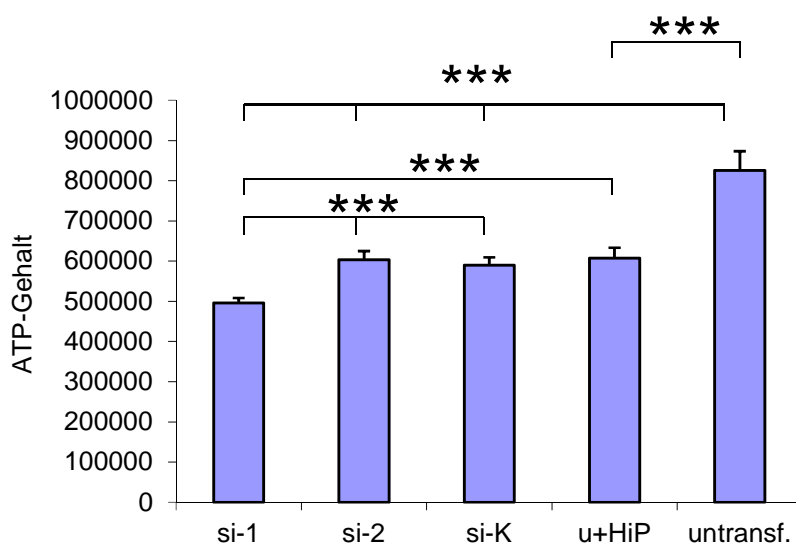
### Zu 3.2.1.2. Zeitabhängigkeit, ATP-Diagramme zu Tabelle 2

#### 24 h



**Abb. 49 zu Tab. 2:** Das Säulendiagramm zeigt  $n=16$  Einzelergebnisse aus 2 unabhängigen Transfektionen. Zur Darstellung des ATP-Gehaltes (in nM) nach siRNA-Transfektion (37,5 ng = 5 nM) nach dem Traditionellen Protokoll nach 24 h für verschiedene Zeiten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,005$  nach Student's T-test.

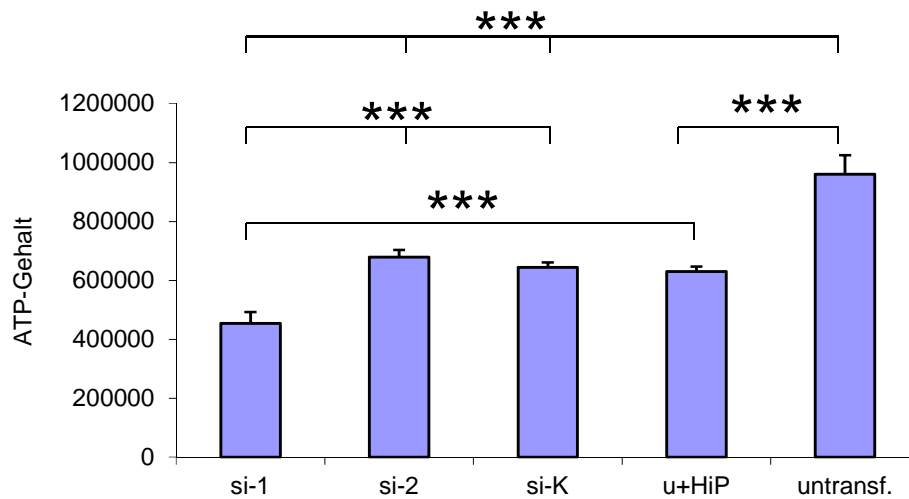
#### 48 h



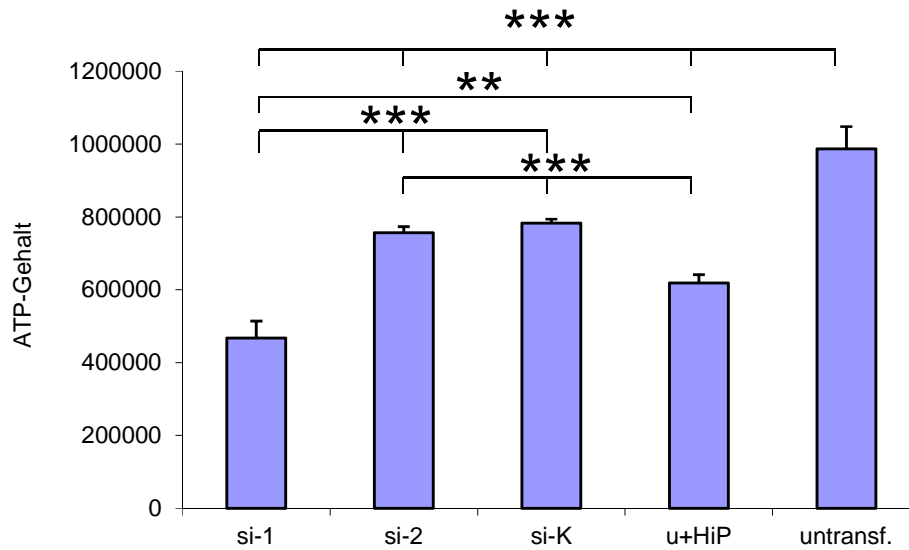
**Abb. 50 zu Tab. 2:** Das Säulendiagramm zeigt  $n=16$  Einzelergebnisse aus 2 unabhängigen Transfektionen. Zur Darstellung des ATP-Gehaltes (in nM) nach

siRNA-Transfektion (37,5 ng = 5 nM) nach dem Traditionellen Protokoll nach 48 h für verschiedene Zeiten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  nach Student's T-test.

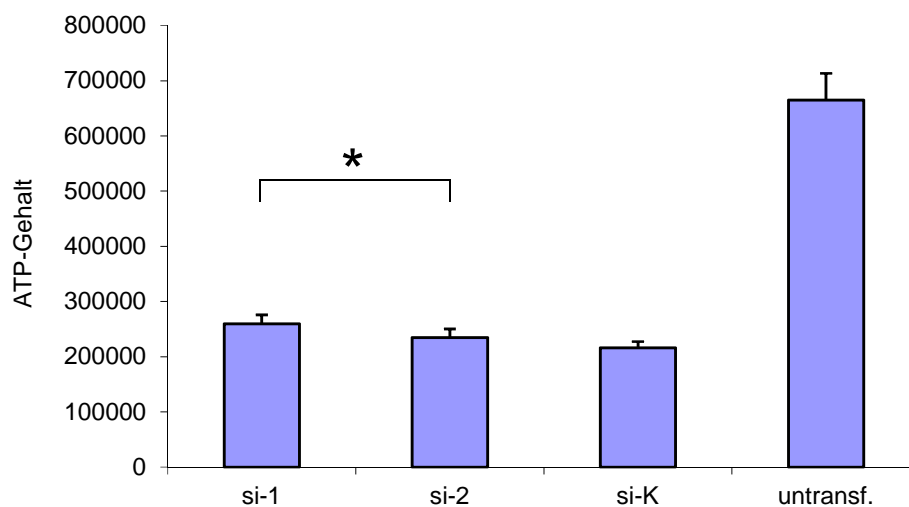
## 72 h



**Abb. 51 zu Tab. 2:** Das Säulendiagramm zeigt  $n=16$  Einzelergebnisse aus 2 unabhängigen Transfektionen. Zur Darstellung des ATP-Gehaltes (in nM) nach siRNA-Transfektion (37,5 ng = 5 nM) nach dem Traditionellen Protokoll nach 72 h für verschiedene Zeiten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  nach Student's T-test.

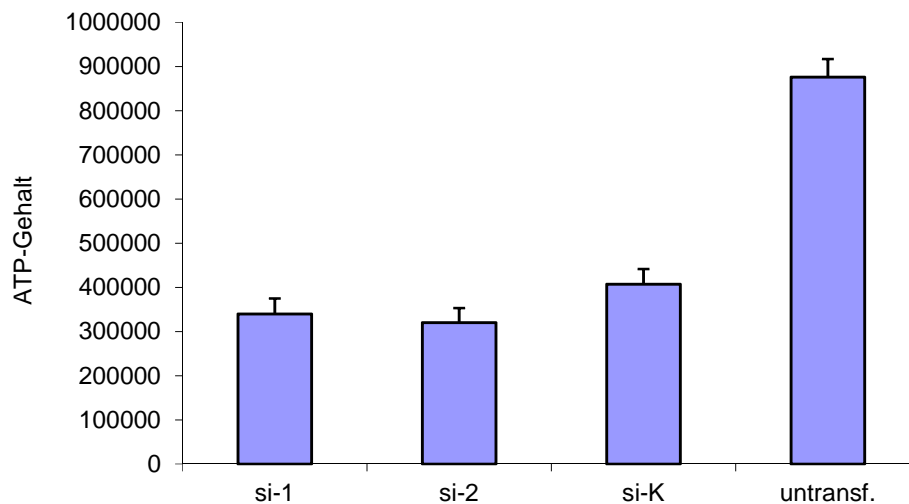
**96 h**

**Abb. 52 zu Tab. 2:** Das Säulendiagramm zeigt n=16 Einzelergebnisse aus 2 unabhängigen Transfektionen. Zur Darstellung des ATP-Gehaltes (in nM) nach siRNA-Transfektion (37,5 ng = 5 nM) nach dem Traditionellen Protokoll nach 96 h für verschiedene Zeiten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  nach Student's T-test.

**Zu 3.2.2.2. Zeitabhängigkeit, ATP-Diagramme zu Tabelle 3****24 h**

**Abb. 53 zu Tab. 3:** Das Säulendiagramm zeigt n=48 Einzelergebnisse aus 6 unabhängigen Transfektionen nach dem Fast Forward Protokoll. Die Abbildung zeigt den ATP-Gehalt (in nM) nach siRNA-Transfektion (37,5 ng = 5 nM) nach 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$  nach Student's T-test.

#### **48 h**



**Abb. 54 zu Tab. 3:** Das Säulendiagramm zeigt n=48 Einzelergebnisse aus 6 unabhängigen Transfektionen nach dem Fast-Forward Protokoll. Die Abbildung zeigt den ATP-Gehalt (in nM) nach siRNA-Transfektion (37,5 ng = 5 nM siRNA) zum Zeitpunkt 48 h. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern ( $\bar{x}$ ), \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$  nach Student's T-test.

## **VIII. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

## **IX. Danksagung**

Die laborchemischen Untersuchungen wurden 2008 während meines klinischen Abschnittes des Medizinstudiums unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Brinkmeier am Institut für Pathophysiologie der Ernst-Moritz-Arndt Universität durchgeführt.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Brinkmeier für die Betreuung der Arbeit während des gesamten Zeitraumes – beginnend bei der Labortätigkeit bis zum Abschluss der Arbeit – bedanken. Vielen Dank für die Vergabe eines sehr interessanten Themas und die gute Betreuung während der letzten Jahre.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Betreuerin Frau Privatdozentin Dr. Christiane Kunert-Keil für ihre Hilfsbereitschaft und Planung der Laborversuche. Vielen Dank für die konstruktive Kritik und für den „roten Faden“ in meinen Laborabläufen.

Vielen Dank für die umfangreiche Hilfestellung der gesamten Arbeitsgruppe des Institutes, dies hat meine Tätigkeit bereichert und einen reibungslosen Ablauf möglich gemacht. Insbesondere möchte ich mich bei Heidrun Kenk sowie Dietlind Schulz für ihre Unterstützung bei den Zellkulturen und den Versuchen bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Joachim Kasch sowie Herrn Dr. Bernd Pritschow für ihre immer bestehende fachliche Ansprechbarkeit und Mithilfe.

Vielen Dank an meinen Bruder für die „Formatierungshilfe“ und die guten Computerkenntnisse.

Vielen Dank an Markus für die Hilfe in der letzten Phase der Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich herzlichst bei meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung während meines Studiums bedanken. Vielen Dank für die Geduld, Nachsicht und Aufmunterung in so vielen Situationen.