

# Untersuchung zur Aktivierung des Ionenkanals TRPM2 durch ADPR und ADPR-Derivate

#### An der Universität Hamburg eingereichte Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften Fachbereich Chemie der Universität Hamburg



durchgeführt am Institut für Biochemie und molekulare Zellbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

vorgelegt von

Winnie Maria Riekehr

Hamburg, 2022

Diese Arbeit wurde von September 2018 bis September 2022 am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikum Eppendorf (Martinistraße 52, 20246 Hamburg) im Rahmen des Projekts A05 des Sonderforschungsbereichs 1328 (Adenine Nucleotides in Immunity and Inflammation) durchgeführt.

Erstgutachter: Dr. Ralf Fliegert Zweitgutachter: Prof. Dr. Chris Meier

Datum der Disputation/Druckfreigabe: 09.12.2022

# Inhaltsverzeichnis

I Publikationsliste	6
II Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung (Deutsch)	9
Abstract (English)	11
1 Einleitung	13
1.1 Ionenkanäle	13
1.1.1 Einordnung: Ionenkanäle und Calciumsignale	13
1.1.2 Die Familie der TRP-Kanäle	15
1.1.3 Ein Familienmitglied unter der Lupe: TRPM2	17
1.2 Sekundäre Botenstoffe	20
1.2.1 Die Adeninnukleotide ADPR und 2dADPR als TRPM2 Agonisten	20
1.2.2 Das Adeninnukleotid cADPR	21
1.3 Methoden zur Untersuchung von TRPM2	22
1.3.1 Patch Clamp Experimente	22
1.3.2 Niedermolekulare Fluoreszenzfarbstoffe	23
1.3.3 Genetisch codierte Calciumsensoren	23
1.3.4 Nanobodies und Intrabodies	24
2 Problemstellung	25
3 Material und Methoden	
3.1.1 Auftauen von Zellen	
3.1.2 Passage der Zellkultur	27
3.1.3 Einfrieren von Zellen	27
3.1.4 Puffer und Lösungen	
3.1.5 Geräte	
3.2 Mutagenese mittels QuikChange PCR	
3.2.2. Modifizierte QuikChange PCR	29
3.2.3 Restriktionsverdau	
3.2.6 Plasmidpräparation	31
3.2.7 Puffer, Lösungen und Kits	31
3.2.8 Geräte	
3.3 Herstellung kompetenter Bakterien	
3.3.1 Herstellung kompetenter E.coli XL1 Blue	
3.3.2 Puffer und Lösungen	
3.3.3 Geräte	32

3.4 Oberflächenbiotinylierung zum Nachweis von TRPM2 in der Plasmamambran	
3.4.1 Transfektion von HEK-239 Zellen	
3.4.2 Oberflächenbiotinylierung	
3.4.3 Extraktion der Membranproteine	
3.4.4 Proteinbestimmung nach Bradford	
3.4.5 Isolation der biotinylierten Proteine	34
3.4.6 SDS-PAGE	34
3.4.7 Western Blot	
3.4.8 Puffer, Lösungen und Kits	
3.4.9 Geräte	
3.5 Patch Clamp Experimente	
3.5.1 Transfektion von HEK-293 Zellen mit JetPEI	
3.5.2 Patch Clamp Ganzzellableitungen	
3.5.3 Statistische Auswertung	40
3.5.4 Puffer und Lösungen	40
3.5.5 Geräte	41
3.6 Reverse Phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	42
3.6.1 HPLC	42
3.6.2 Puffer und Lösungen	42
3.6.3 Geräte	42
4 Ergebnisse	43
4.1 Die Rolle der Nukleotidbindungsstellen für die Aktivierung von TRPM2	43
4.1.1 Erstellung einer MHR1/2 Mutante	43
4.1.2 Nachweis der Expression der Mutanten in der Plasmamembran	44
4.1.3 Untersuchung der Aktivität der TRPM2-Mutanten	46
4.2 Die Rolle von cADPR als TRPM2 Agonist	48
4.2.1 Untersuchung der Aktivierbarkeit von TRPM2 durch cADPR	48
4.2.1 Inhibition von TRPM2 durch 8-Br-ADPR und 8-Br-cADPR	54
4.3 Etablierung eines Intrabody-basierten Reportersystems	55
5 Diskussion	61
5.1 Die Bedeutung der Nukleotidbindungsstellen für die Aktivierung von hTRPM2	61
5.1.1 Die Bindungsstelle für Nukleotide in der NUDT9H Domäne	61
5.1.2 Die Bindungsstelle für Nukleotide in der MHR1/2 Domäne	62
5.1.3 Die relative Bedeutung der beiden Nukleotidbindungsstellen	63
5.2 cADPR ist kein TRPM2 Agonist	63
5.3 Die Rolle von IDPR und cIDPR	69
5.4 Das TRPM2 Reportersystem	69

5.6 Ausblick	70
5.6.1 Zur Öffnung von TRPM2 werden beide Nukleotidbindungsstellen benötigt	70
5.6.2 cADPR ist kein TRPM2 Agonist	71
5.6.3 Das Intrabody-basierte Reportersystems	71
6 Literaturliste	72
7 Gefahrenstoffe	80
7.1 Gefahrenstoffe und ihre GHS-Zuordnung	80
7.2 H- und P-Sätze	83
7.3 Entsorgung	85
8 Danksagung	86
9 Eidesstattliche Erklärung	87

# I Publikationsliste

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen:

Fliegert R, <u>Riekehr WM</u>, Guse AH (2020) *Does Cyclic ADPR-Ribose (cADPR) Activate the Non*selective Cation Channel TRPM2? Front Immunol 11:2018

<u>Riekehr WM</u>, Sander S, Pick J, Tidow H, Bauche A, Guse AH, Fliegert R (2022) *cADPR does not activate TRPM2* Int J Mol Sci 23, 3163

Dieser Artikel wurde unter der Creatice Commons Lizenz CC BY 4.0 veröffentlicht (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), die die Weiterverwendung und Anpassung der veröffentlichen Materialien gestattet. Von diesem Recht wurde Gebrauch gemacht und Abbildungen sowie Abbildungsteile in dieser Arbeit präsentiert, was an den entsprechenden Stellen kenntlich gemacht ist.

# II Abkürzungsverzeichnis

2-APB: 2-Aminoethoxydiphenylborat 2dADPR: 2'-Desoxyadenosin-5'-diphosphoribose 8-Br-ADPR: 8-Bromoadenosin-5'-diphosphoribose 8-Br-cADPR: 8-Bromo cyclische Adenosin-5'-diphosphoribose ADPR: Adenosin-5'-diphosphoribose AMP: Adenosinmonophosphat ATP: Adenosintriphosphat AU: Arbitrary unit, willkürliche Einheit cADPR: cyclische Adenosin-5'-diphosphoribose CEPIA: Calcium-measuring organelle-entraped protein indicator DAG: Diacylglycerol DMEM: Dulbecco's Modefied Eagle's Medium EC<sub>50</sub>: Mittlere effektive Konzentration EM: Elektronenmikroskopie ER: Endoplasmatisches Retikulum Fura-2/AM: Fura-2-acetoxymethylester GECI: Genetically encoded calcium indicator GECO: Genetically encoded calcium indicator for optical imaging GFP: Grün fluoreszierendes Protein HPLC: high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie HRP: Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase hTRPM2: humanes TRPM2 IC<sub>50</sub>: Mittlere inhibitorische Konzentration IP<sub>3</sub>: Inositol-1,4,5-trisphosphat LTRPC2: Long TRP-Channel 2, veraltete Bezeichnung für TRPM2 MHR: Melastatinhomologe Region MHR1/2: Melastatinhomologe Region 1/2 drMHR1/2: Danio rerio MHR1/2 hMHR1/2: humane MHR1/2 nvMHR1/2: Nematostella vectensis MHR1/2 NAD<sup>+</sup>: Nikotinamidadenindinukleotid NMDG: N-Methyl-D-Glucamin NCX: Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger NMDA-Rezeptor: N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor Nudix Hydrolase: Nukleosid Diphosohat verknüpft mit Rest X Hydrolase NUDT9: Nudix Type Motif 9 NUDT9H Domäne: NUDT9 homologe Domäne drNUDT9H: Danio rerio NUDT9H hNUDT9H: humane NUDT9H nvNUDT9H: Nematostella vectensis NUDT9H

**RT:** Raumtemperatur **OD: Optische Dichte** PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat SERCA: Sarcoplasmatic/Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPase SOCE: Store operated calcium entry SR: Sarkoplasmatisches Retikulum STIM: Stromal Interaction Molecule **TRP: Transient Receptor Potential** TRPA: TRP ankyrin TRPC: TRP canonical (manchmal auch als classical bezeichnet) TRPM: TRP melastatin TRPM2: Transient Receptor potential melastatin 2 drTRPM2: Danio rerio TRPM2 hTRPM2: humanes TRPM2 nvTRPM2: Nematostella vectensis TRPM2 TRPML: TRP mucolipin TRPN: TRP Drosophila NOMPC (no mechanoreceptor potential C) TRPP: TRP polycystin TRPV: TRP vanilloid TRPY: TRP yeast VSLD: voltage sensor-like domain, Spannungssensor-artige Domäne wt: Wildtyp

# Zusammenfassung (Deutsch)

Bei TRPM2 handelt es sich um einen Kationenkanal, der permeabel für Natrium-, Kaliumund Calciumionen ist. Der Kanal kann durch die Agonisten Adenosin-5'-diphosphoribose (ADPR) und 2'-Desoxy-ADPR geöffnet werden, wobei sich die Calciumionenkonzentration, die Temperatur und der pH-Wert auf das Öffnungsverhalten auswirken. Ob es sich auch bei cyclischer ADP-Ribose (cADPR) um einen TRPM2 Agonisten handelt, wird in der Literatur seit längerem kontrovers diskutiert.

In den letzten Jahren konnte dank der Weiterentwicklung der Elektronenmikroskopie die Struktur verschiedener TRPM2-Orthologe aufgeklärt werden, ein wichtiger Schritt zum besseren Verständnis der Regulation des Kanals.

Es wurde beobachtet, dass die NUDT9H-Domäne in TRPM2 aus der Seeanemone *Nematostella vectensis* zwar katalytische Aktivität aufweist und den Liganden hydrolytisch spaltet, aber nicht zur Aktivierung des Kanals erforderlich ist. Im Gegensatz dazu ist die NUDT9H Domäne in Wirbeltieren katalytisch inaktiv. Dies deutet darauf hin, dass es im Verlauf der Evolution zu Veränderungen in der Funktionsweise des Kanals gekommen ist. Die relativen Beiträge der strukturell unterschiedlichen Bindungsstellen für die Aktivierung des humanen Kanals sind noch nicht hinreichend geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der beiden Bindungsstellen für die Aktivierung des humanen Kanals näher untersucht, indem die Bindung von Nukleotiden durch Punktmutationen verhindert wurde. Dabei zeigte sich, dass die Inaktivierung jeweils einer Bindungsstelle dazu führt, dass der Kanal weder durch ADPR noch durch 2'-Desoxy-ADPR aktivierbar ist.

Darüber hinaus wurde der Frage nachgegangen, ob es sich bei dem sekundären Botenstoff cADPR um einen TRPM2 Agonisten handelt. cADPR wird seit langem als möglicher Agonist für TRPM2 diskutiert und die Beobachtung, das ADPR in der MHR1/2 Domäne in einer Hufeisen-förmigen Konformation vorliegt, könnte darauf hindeuten das cADPR an die MHR1/2 Domäne zu binden vermag. In einigen Publikation konnte der durch cADPR induzierte Strom zudem durch den cADPR-Antagonisten 8-Br-cADPR unterdrückt werden. Mittels elektrophysiologischen Messungen an TRPM2 exprimierenden HEK-293 Zellen wurde die Wirkung von cADPR auf TRPM2 unter verschiedenen Bedingungen untersucht. In keiner der untersuchten Bedingungen führte die Infusion von cADPR zu einer Aktivierung des Kanals. Auch die Co-Infusion von cADPR zusammen mit einer ADPR Konzentration, die gerade noch keine Aktivierung des Kanals hervorruft, führte zu keiner Zunahme des Stroms in den Zellen. Ein in der Literatur beschriebener, synergistischer Effekt von cADPR und ADPR konnte dementsprechend nicht bestätigt werden.

Um den Unterschied zwischen ADPR und cADPR noch besser herauszuarbeiten, wurde zudem mit IDPR und N1-cIDPR gearbeitet. Bei N1-cIDPR handelt es sich im Vergleich zu cADPR um ein hydrolyse-stabileres Molekül. Als cADPR analoges Molekül kann es Calciumionen freisetzen. Auch IDPR wurde bereits zuvor als TRPM2 Agonist beschrieben, jedoch konnte mit kommerziell erhältlichem IDPR kein TRPM2-Strom beobachtet werden. Auch durch N1-cIDPR ließ sich hTRPM2 nicht aktivieren. Um die Aktivierung von TRPM2 in Zellen mittels Imaging zu untersuchen wurde ein Reportersystem etabliert, bei dem ein genetisch-codierter Ca<sup>2+</sup>-Indikator für optisches Imaging (GECO) durch einen Intrabody an den Kanal gebunden wurde. TRPM2 wurde dafür mit einem nicht natürlich vorkommenden Epitop (ALFA-tag) exprimiert. Der bidirektionale Expressionsvektor enthielt zudem die codierende Sequenz für ein Fusionsprotein aus dem  $\alpha$ -ALFA-Intrabody und dem genetisch encodierten Ca<sup>2+</sup>-Indikator (GECO). Dieser Vektor wurde in HEK-293-Zellen exprimiert und die Funktion des Systems elektrophysiologisch und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Elektrophysiologisch zeigte sich, dass die Fusion des ALFA-tags an den N-Terminus von TRPM2 die Aktivierung durch ADPR nicht beeinträchtigt. In einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop konnte eine Zunahme der GECO-Fluoreszenz nach Infusion von ADPR über die Patch-Pipette beobachtet und somit die Eignung des Konstrukts als Reportersystem demonstriert werden.

# Abstract (English)

TRPM2 is a cation channel permeable to sodium, potassium and calcium ions. Gating is mediated by the agonist ADPR and the superagonist 2'-deoxy-ADPR as well as influenced by intra- and extracellular calcium ion concentration, temperature and the pH. Whether the second messenger cADPR is a TRPM2 agonist has been controversially discussed for years. During recent years progress in electron microscopy resulted in the solution of structures of different TRPM2 orthologues, an important step to understand the regulation of the channel. The N-terminal MHR1/2 domain and the C-terminal NUDT9H domain each feature a nucleotide binding site. The NUDT9H domain of the sea anemone *Nematostella vectensis* has been demonstrated to be catalytically active yet dispensable in the gating process, whereas this domain shows no catalytic activity in vertebrates. This points to the possibility of a functional shift during evolution. The relative contributions of both binding sites in the gating of human TRPM2 could not be sufficiently resolved so far.

In this thesis the relative relevance of both binding sites was examined by introducing point mutations incapacitating nucleotide binding to the respective site. Interfering with either nucleotide binding this way resulted in a complete loss of gating function for both ADPR and 2'-deoxy-ADPR.

Furthermore, investigations on the potential of cADPR is a TRPM2 agonist were performed, since this molecule has long been discussed in this capacity. The demonstration of ADPR binding to the MHR1/2 domain binding site in a horseshoe like conformation seems to indicate the potential for cADPR binding to this site as well. Some publications show an inhibition of cADPR mediated currents via 8-Br-cADPR. The effect of cADPR on HEK-292 cells expressing hTRPM2 under different conditions was investigated by patch clamp measurements. Infusion of cADPR was unable to elicit a current under any of the tested conditions. Co-infusion of ADPR with sub-activation-threshold concentrations of ADPR showed no increase in current. The published synergistic effect of ADPR and cADPR could therefore not be confirmed.

IDPR and *N*1-cADPR were used to demonstrate the difference between cADPR and ADPR even more clearly. While cADPR can degrade to ADPR, *N*1-cIDPR does not degrade to IDPR. Said IDPR has been described as a TRPM2 agonist, yet infusion of commercially available IDPR did not result in TRPM2 currents. *N*1-cIDPR was unable to elicit TRPM2 currents, too.

It would be useful to visualize the activation of TRPM2. Therefore a reporter system was established in which a genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicator for optical imaging (GECO) bound to TRPM2 via an intrabody. A non-natural epitope called ALFA-tag was introduced in a target protein, in this case TRPM2, and functions as the intrabody binding site.

The coding sequences of the tagged TRPM2 and the GECO-intrabody fusion protein were transfected into HEK-293 cells using a bidirectional expression vector, so cells expressing the reporter system could be measured using electrophysiological measurements and fluorescence microscopy.

It could be demonstrated in electrophysiological experiments, that fusing the ALFA-tag to

the N-terminus of TRPM2 did not interfere with channel activation be ADPR. An increase in GECO-fluorescence after infusion of ADPR was observed in wide field fluorescence microscopy.

# 1 Einleitung

# 1.1 Ionenkanäle

#### 1.1.1 Einordnung: Ionenkanäle und Calciumsignale

Calciumionen spielen in Zellen als sekundärer Botenstoff eine Rolle, um unzählige physiologische Prozesse zu regulieren (1). Dazu gehören beispielsweise die Muskelkontraktion (2), die Sekretion von Neurotransmittern (3) und die Proliferation von T-Zellen (4). Zur Vermittlung dieser Signalwirkung braucht es Möglichkeiten, um die Calciumionenkonzentration in verschiedenen Kompartimenten genau einstellen zu können. Neben aktiven Transportern sind Ionenkanäle eine dieser Möglichkeiten.

Es gibt unterschiedliche Regulationsmechanismen zur Steuerung der Öffnung von Ionenkanälen: Die beiden Hauptmechanismen dabei sind die Steuerung über Spannung und über Liganden, es gibt jedoch auch mechano- (5), licht- (6) und temperatursensitive (7) Ionenkanäle. Zellen, die über spannungsgesteuerte Calciumionenkanäle verfügen, bezeichnet man als elektrisch erregbare Zellen, während Zellen ohne diese Kanäle elektrisch nicht erregbare Zellen genannt werden (1).

In elektrisch erregbaren Zellen löst eine Depolarisation die Öffnung spannungsgesteuerter Ionenkanäle aus, sodass auf die initiale Depolarisierung ein weiterer Ionenstrom durch spannungsabhängige Kanäle folgt, der in Neuronen als Aktionspotential messbar ist. Zu diesen spannungsgesteuerten Kanälen gehören unter anderem spannungsabhängige Calciumionenkanäle. (8).

Calciumionen dienen jedoch nicht nur als Träger elektrischer Ladung, sondern fungieren auch als Signalmolekül, das in elektrisch erregbaren und elektrisch nicht erregbaren Zellen die Funktion von Proteinen reguliert.

Ein Beispiel für einen solchen Signalweg in elektrisch nicht-erregbaren Zellen liefert die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren: Bindet der passende Ligand an einen dieser Rezeptoren, der an ein heterotrimeres  $G_q$  Protein gekoppelt ist, zerfällt dieses  $G_q$  Protein in die  $\alpha$ -Untereinheit (mit gebundenem GTP) und die  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ -Untereinheit Gaq/11 stimuliert die Phospholipase C $\beta$ , die daraufhin Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), ein Phospholipid innerhalb der Plasmamembran, hydrolysiert (9). Die entstehenden Produkte sind Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG): IP<sub>3</sub> ist der Ligand des IP<sub>3</sub>-Rezeptor Calciumkanals, der in der ER-Membran zu finden ist. Bindet der Ligand an den Rezeptor, so kommt es zur Freisetzung von Calciumionen aus dem ER ins Zytoplasma (10). DAG aktiviert gemeinsam mit Calciumionen bestimmte Isoformen der Proteinkinase C, die wiederum ihrerseits unterschiedliche Proteine phosphorylieren und in ihrer Funktion modulieren können (11).

Ebenso wie der IP<sub>3</sub>-Rezeptor erlaubt auch der Ryanodinrezeptor im geöffneten Zustand eine Freisetzung von Calciumionen aus dem ER (bzw. dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), da der Ryanodinrezeptor stark in Muskelzellen exprimiert wird) ins Zytoplasma (12). Er wird nicht nur von Adeninnukleotiden, sondern auch von der zytoplasmatischen Calciumund Magnesiumionenkonzentration (13) reguliert und kann beispielsweise durch Koffein pharmakologisch beeinflusst werden (14). Aktive Transporter, die Calciumionen wieder aus dem Zytoplasma entfernen, verhindern eine dauerhafte Erhöhung der Calciumionenkonzentration. Die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums (SERCA: Sarcoplasmatic/ Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPase) transportiert Calciumionen unter energetischer Kopplung an die ATP-Hydrolyse ins ER bzw. SR (15, 16). Jedoch werden Calciumionen aus dem Zytosol nicht nur in intrazelluläre Speicher, sondern auch aus der Zelle hinaus transportiert. Diese Funktion erfüllt die Plasmamembran Calcium ATPase (PMCA), die zwar eine hohe Affinität zu Calciumionen (17), aber eine geringe Transportgeschwindigkeit aufweist. Dementsprechend kann sie zytoplasmatische Calciumionenkonzentration zwar auf einem niedrigen Niveau (in einer Größenordnung von 100 nM) halten, dieses aber nach einem Signal, bei dem die Calciumionenkonzentration deutlich angestiegen ist, nicht schnell wiederherstellen (18). Vor allem in elektrisch erregbaren Zellen gibt es zudem den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger) (19), der mit niedrigerer Affinität, aber hoher Geschwindigkeit in einem Antiport je ein Calciumion aus der Zelle hinaus und drei Natriumionen hinein befördert, wobei der Konzentrationsgradient für Natriumionen, aufgebaut von der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, die Triebkraft für den Transport liefert (20).

Nicht nur in den Membranen von ER und SR, sondern auch in der Plasmamembran existieren Kanäle, die permeabel für Calciumionen sind, und durch die diese ins Zytoplasma einströmen können. In einem Prozess namens SOCE (store operated calcium entry) wird ein Calciumioneneinstrom in die Zelle mithilfe von STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1) (21) und Orai1 (22) ausgelöst, sobald die Calciumionenkonzentration im ER sinkt. STIM ist ein Protein in der ER-Membran, das als Calciumsensor des ER fungiert. Wenn die Calciumionenkonzentration unter eine bestimmte Schwelle sinkt, assoziiert es mit Orai1, einem Calciumkanal in der Zellmembran, der sich daraufhin öffnet (23).

Ein weiteres Beispiel für einen Kanal, der einen Calciumionenstrom durch die Plasmamembran vermittelt, ist der NMDA-Rezeptor (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor), ein synaptischer Glutamatrezeptor (24). Er ist allerdings nicht selektiv für Calciumionen. Stattdessen handelt es sich um einen Kationenkanal, den beispielsweise auch Natrium- und Kaliumionen durchqueren können (25). Darin ähnelt der NMDA-Rezeptor den Kanälen der TRP-Kanal-Superfamilie (Transient Receptor Potential), bei denen es sich ebenfalls um Kationenkanäle handelt, die nicht nur ein bestimmtes Kation passieren lassen, wobei die Leitfähigkeit und Permeabilität für einzelne Ionen zwischen den unterschiedlichen TRP-Kanälen variiert (26).

#### 1.1.2 Die Familie der TRP-Kanäle

Die Bezeichnung TRP (transient receptor potential) kann auf die im Jahr 1969 entdeckte *trp* Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zurückgeführt werden. Diese zeichnete sich phänotypisch dadurch aus, dass die Sicht der Tiere, nachdem sie sich im Dunkeln befunden haben, länger brauchte, um sich wieder an helles Licht anzupassen. Im Elektroretinogramm zeigte sich, dass das Rezeptorpotential der mutierten Zellen sehr viel schneller abnahm als beim Wildtyp, wenn diese hellem Licht ausgesetzt wurden (27). Dass es sich bei dem mutierten Gen um einen Ionenkanal handelte, wurde allerdings erst klar, nachdem es kloniert und das Genprodukt näher untersucht worden war (28).

Die Proteine der TRP-Superfamilie bilden tetramere Kanäle, die sowohl als homomere wie auch heteromere Kanäle innerhalb einer Unterfamilie wie auch zwischen verschiedenen Unterfamilien vorkommen. Zusätzlich existieren unterschiedliche Spleißvarianten, sodass insgesamt über hundert unterschiedliche TRP-Kanäle beschrieben wurden (29).

Die unterschiedlichen *trp* Gene wurden nach ihrer Sequenzähnlichkeit in sieben Unterfamilien eingeteilt (29). Seit der Entdeckung des TRPY1 Kanals im Jahr 2001 gibt es zudem eine achte TRP-Familie, in die bisher drei weitere Mitglieder eingruppiert wurden (30).

Familie	Familienbezeichnung
TRPA	ankyrin
TRPC	canonical (auch classical)
TRPM	melastatin
TRPML	mucolipin
TRPN	Drosophila NOMPC
TRPP	polycystin
TRPV	vanilloid
TRPMY	yeast

#### Tabelle 1.1 Die acht TRP-Kanal-Familien

Die humane TRPA-Familie besteht nur aus einem einzigen Mitglied, TRPA1, einem Rezeptor für schmerzhafte Kältereize (31), während *Drosophila melanogaster* über vier unterschiedliche TRPA Kanäle verfügt: TRPA1-3 und Pain, die alle in die Wahrnehmung von Temperatur und Schmerz involviert sind (32).

Die TRPC-Familie besteht aus sieben Mitglieder, TRPC1-7, wobei *trpc2* bei Menschen ein Pseudogen ist, während es bei Mäusen funktionelle Kanäle bildet, die im Kontext von SOCE aktiviert werden (33). TRPC Monomere bilden nicht nur heteromere Kanäle mit unterschiedlichen Mitgliedern der eigenen Proteinfamilie (34), sondern auch mit TRP-

Kanälen anderer Unterfamilien, wie beispielsweise mit TRPP2 (35) oder mit TRPP2 und zusätzlich TRPV4 (36) und werden zudem in vielen unterschiedlichen Zelltypen exprimiert. Dementsprechend sind TRPC-Kanäle in eine ganze Reihe unterschiedlicher Prozesse involviert, von der Entwicklung des fetalen Gehirns (37, 38) bis zur Angiogenese in Nierenzellkarzinomen (39).

Die acht Kanäle der TRPM-Familie haben ebenfalls unterschiedliche Funktionen. TRPM1 wird von Melanom-Metastasen exprimiert und kann daher als diagnostischer Marker für diese genutzt werden (40). TRPM4 ist unter anderem in die Aktivierung von Mastzellen bei allergischen Reaktionen involviert (41) und TRPM8 in die Kältedetektion (42).

TRPML1 wurde entdeckt, da es das entscheidende Gen im Rahmen der rezessiv vererblichen, neurodegenerativen Erkrankung Mukolipidose Typ IV ist. Es handelt sich dabei um einen Ionenkanal in der Membran von Lysosomen (43). TRPML2 scheint im Kontext der B-Zellen eine Aufgabe im Immunsystem zu erfüllen (44) während eine TRPML3-Mutationen bei Mäusen unter anderem zu einem Hörverlust führt (45).

Eine Familie von TRP-Kanälen, die in Säugetieren nicht vorkommt, sind die TRPN-Kanäle. Diese finden sich in Zebrafischen (*Danio rerio*) und in Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*). Entdeckt wurde der erste TRPN Kanal in *Drosophila melanogaster* als NOMPC (no mechanoreceptor potential C) und seine Funktion liegt in der Wahrnehmung mechanischer Reize wie beispielsweise Vibration (32).

Die Vertreter der TRPP-Familie sind nach ihrer Assoziation mit der erblich bedingten, polycystischen Nierenerkrankung benannt. Ihre Nomenklatur ist durch Doppelbenennungen und Namensänderungen sehr komplex geworden, daher soll an dieser Stelle nur erwähnt werden, dass beim Menschen lediglich die Kanäle TRPP2, TRPP3 und TRPP5 vorkommen (30).

Zur TRPV-Familie gehören die Proteine TRPV1-6, die unter anderem in der Temperaturund Schmerzrezeption eine Rolle spielen. Für die Entdeckung von TRPV1, der durch Hitze und Capsaicin aktiviert wird (7), und einen Ansatzpunkt für die pharmakologische Intervention bei neuropathischen Schmerzen bietet, wurde David Julius im Jahr 2021 mit dem Nobelpreis geehrt (gemeinsam mit Ardem Patapoutian, für die Entdeckung der mechanosensitiven Piezo Kanäle) (46). Auch die TRPV Kanäle haben jedoch mehr als eine Funktion, sodass beispielsweise TRPV5 an der Resorption von Calciumionen in der Niere beteiligt ist (47).

Die noch relativ neu entdeckte Familie der TRPY Kanäle besteht bisher aus den Mitgliedern TRPY1-4, die sich in der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) finden. Über sie ist bisher noch nicht sonderlich viel bekannt (48, 49).

Während alle diese Subfamilien zur TRP-Superfamilie gehören, lässt sich noch eine weitere Unterteilung vornehmen: TRPP und TRPML-Proteine sind einander sehr ähnlich, weisen aber größere Unterschiede zu den anderen TRP-Kanälen auf: Einerseits besteht eine geringere Sequenzhomologie, andererseits zeichnen sich diese beiden Subfamilien auch durch eine deutlich längere loop-Struktur zwischen den ersten beiden Transmembranabschitten aus, die in den anderen TRP-Kanälen nicht vorkommt. Daher rechnet man TRPP und TRPML der Gruppe 2 zu, während alle anderen Vertreter in die Gruppe 1 fallen (50).

#### 1.1.3 Ein Familienmitglied unter der Lupe: TRPM2

Der TRP-Kanal, der in dieser Arbeit näher betrachtet werden soll, ist TRPM2 – nicht zu verwechseln mit Clusterin, das bis 1992 ebenfalls unter dem Namen TRPM2 (testosteronerepressed prostate message 2) geführt wurde (51). Vor seiner Einordnung in die Familie der TRPM-Kanäle wurde TRPM2 zunächst als TRPC7 (52) (TRP-Channel 7 – nicht zu verwechseln mit dem aktuellen TRPC7, der zur Subfamilie der TRPC-Kanäle gehört) und als LTRPC2 (53) (long TRP-Channel 2) bezeichnet. Die Nomenklatur der TRP Kanäle wurde 2003 vereinheitlicht, sodass der Kanal nun nur noch als TRPM2 bezeichnet werden sollte (29). Das *trpm2* Gen befindet sich im menschlichen Genom auf Chromosom 21q22.3 (52, 54).

Das Gen *trpm2* wird in unterschiedlichen Organen und Geweben exprimiert. In erster Linie wurde die Expression im Gehirn und im Knochenmark nachgewiesen, wobei die Expression in Purkinje-Zellen des Cerebellums und in hämatopoetischen Zellen besonders hoch ist. Man findet TRPM2 jedoch auch in anderen Zellen des Gehirns, lymphatischen Geweben, geschlechtsspezifischen Zellen, Hautzellen wie Keratinozyten und Melanozyten, in der Bauchspeicheldrüse und anderen Drüsengeweben (55).

Ein einzelnes TRPM2 Protein hat ein Molekulargewicht von etwa 170 kDa (52) und beginnt am N-Terminus mit den für die TRPM-Familie namensgebenden, melastatinhomologen Regionen MHR1-4. Diese sind durch den Pre-S1-Bereich, der sich bereits in der Membran befindet, diese allerdings nicht durchspannt, mit den transmembranären Helices S1-6 verbunden. Bei den Helices 1-4 handelt es sich um eine Region, die den Spannungssensoren in spannungsabhängigen Kanälen ähnelt, weshalb sie als VSLD (voltage sensor-like domain) bezeichnet werden, auch wenn TRPM2 selbst kein spannungsabhängiger Kanal ist (dazu fehlen die geladenen Aminosäuren in der S4-Helix). Die eigentliche Pore des Kanals wird von den S5 und S6 Helices der vier TRPM2 Untereinheiten gebildet. Daran anschließend findet man die beiden TRP-Helices, die Rib- und die Pole-Helix, die weit in den zytoplasmatischen Teil des Proteins hinein reichen und die tetramere Struktur des Kanals zusammen halten. C-terminal findet sich die NUDT9H Domäne (56). NUDT9 (Nudix Hydrolase Typ Motiv 9) ist ein Enzym der Nudix Familie. Bei der Nudix-Familie handelt es sich um Hydrolasen, die Nukleosid-Diphosphate von anderen Resten X abspalten. Die Domäne in TRPM2, die große Sequenzähnlichkeit zu eben jenem Enzym aufweist, trägt daher den Namen NUDT9 homologe Domäne (53).

Die dreidimensionale Struktur des tetrameren Kanals lässt sich in drei generelle Abschnitte einteilen: Der obere Abschnitt bezeichnet den transmembranären Bereich von TRPM2, und schließt dabei den kleinen, extrazellulären Anteil des Kanals mit ein. Im unteren Abschnitt befinden sich die N-terminalen MHR1/2 und 3 Domänen, sowie die C-terminale NUDT9H Domäne, die sich zwar in der Primärstruktur an den beiden entgegengesetzten Enden befinden, im gefalteten Protein allerdings räumlich nebeneinander angeordnet sind. Den Bereich zwischen dem oberen und unteren Abschnitt mit der MHR 4 Domäne, Rib- und Pole Helix nennt man dementsprechend den mittleren Abschnitt, wobei die Pole Helix durch den mittleren und den unteren Abschnitt verläuft (56).



Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der räumlichen Struktur von TRPM2

Die unterschiedlichen Anteile eines TRPM2 Monomers in ihrer räumlichen Anordnung, in zweidimensionaler Darstellung: Die N-terminale MHR1/2 Domäne (blau) und die C-terminale NUDT9H Domäne (pink) sind farblich hervorgehoben.

Diese generelle Struktur wurde im Jahr 2018 für TRPM2 aus der Seeanemone *Nematostella vectensis* (nvTRPM2) mittels Elektronenmikroskopie (EM) aufgeklärt (57) und konnte sowohl für den Kanal aus dem Zebrafisch *Danio rerio* (drTRPM2) (58) als auch für den menschlichen Kanal (hTRPM2) (56) bestätigt werden.

Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen der C-terminalen Domäne von TRPM2 zu NUDT9 wurde zunächst nach dem Substrat dieses Enzyms gesucht. Dabei stellte sich heraus, dass es ADPR (Adenosin-5'-Diphosphoribose) zu AMP (Adenosinmonophosphat) und Ribose-5-phosphat hydrolysiert. Anschließende Versuche mit TRPM2 zeigten, dass dieses Substrat als Agonist fungiert, der in der Lage ist, die Öffnung des Kanals zu bewirken (53). Ebenso wie TRPM2 verfügen auch TRPM6 und TRPM7 jeweils über eine C-terminale Enzymdomäne, wobei es sich in beiden Fällen um Proteinkinasen handelt (59,60). Dies inspirierte die Prägung des Begriffs *chanzyme* (Kofferwort aus channel und enzyme, ein Kanalenzym) für die drei Mitglieder der TRPM Familie (61).

Es stellte sich allerdings heraus, dass die NUDT9H Domäne im hTRPM2 eine Mutation aufweist, die zu einer deutlichen Reduktion der katalytischen Aktivität im Vergleich zum NUDT9 Enzym führt: Die Wechselzahl k<sub>cat</sub> ist laut Shen und Kollegen etwa drei Größenordnungen kleiner, die Michaelis-Menten-Konstante K<sub>M</sub> hingegen doppelt so groß (62), während Gattkowski gar keine katalytische Aktivität nachweisen konnte (63). Zudem ist die Enzymaktivität nicht nötig für die Funktion des Kanals (64).

Im nvTRPM2 ist die Enzymaktivität allerdings deutlich messbar. Der Aktivitätsunterschied lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass die Aminosäuren 1443 und 1444 in nvTRPM, Glutamat und Phenylalanin denen in NUDT9 entsprechen, während an der korrespondierenden Stelle im hTRPM2 1405 und 1406 durch Isoleucin und Leucin ersetzt sind (65).

Auch im drTRPM2 handelt es sich bei den entsprechenden Aminosäuren 1372 und 1373 um Isoleucin und Leucin, sodass auch die isolierte NUDT9H Domäne aus drTRPM2 keine relevante, katalytische Aktivität aufweist (66).

Die ursprüngliche Annahme, dass die Aktivierung von TRPM2 durch die Bindung von ADPR an die NUDT9H Domäne vermittelt würde, wurde dadurch in Frage gestellt, dass nvTRPM2 auch dann noch durch ADPR aktiviert werden kann, wenn die NUDT9H Domäne entfernt wurde (65). Jedoch wurde eine zweite ADPR Bindungsstelle in der MHR1/2 Region von drTRPM2 entdeckt (58), die auch in den Sequenzen andere Spezies wiederzufinden ist. Es erscheint also folgerichtig, dass die Bindung von ADPR in der MHR1/2 Domäne die Aktivierung von nvTRPM2 vermittelt.

Allerdings stellt sich die Situation sowohl im humanen als auch im drTRPM2 möglicherweise anders dar. Punktmutationen in den jeweiligen NUDT9H Domänen führen dazu, dass der Kanal nicht mehr durch ADPR geöffnet werden kann, während die intakte Domäne über die Speziesgrenze hinweg vertauscht werden kann, ohne dass der Kanal seine Funktion einbüßt (67, 68, 69).

Dies deutet darauf hin, dass sich die Funktionen der ADPR-Bindungsstellen im Laufe der Evolution verändert haben könnten, sodass unterschiedliche Aktivierungsmechanismen in den verschiedenen Spezies auftreten (70).

Abgesehen von seiner Struktur und dem Aktivierungsmechanismus ist selbstverständlich auch die Funktion von TRPM2 im Kontext der Zellen interessant. Zunächst war nur bekannt, dass der Kanal an der Apoptose von Zellen im Kontakt mit reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt ist (71). In den folgenden Jahren wurden jedoch weitere physiologische Funktionen von TRPM2 entdeckt: Der Kanal spielt eine Rolle in der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten (72), bei der Produktion von Chemokinen in Monozyten (73) und bei der Regulation der Körperkerntemperatur (74). Die Aktivierung des Kanals wird abgesehen von ADPR (und anderen Agonisten) durch die Temperatur (74), den pH-Wert (75) und die freie Calciumionenkonzentration (76) sowie Calmodulin mit gebundenen Calciumionen (77) beeinflusst.

# 1.2 Sekundäre Botenstoffe

Sekundäre Botenstoffe sind kleine Moleküle oder, wie im Fall von Ca<sup>2+</sup>, Ionen, die innerhalb der Zelle auf ein primäres Signal hin freigesetzt oder produziert werden und über eine eigene Signalwirkung verfügen. Dabei können sie direkt auf ein Zielprotein wirken oder als Teil einer Signalkette fungieren. Beispiele für sekundäre Botenstoffe sind die bereits erwähnten Calciumionen, IP<sub>3</sub> (10), Stickstoffmonoxid (78) und verschiedene Nukleotide wie beispielsweise cAMP(79).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen vor allem drei Adeninnukleotide näher betrachtet werden: Der TRPM2-Agonist ADPR, der Superagonist 2'-Deoxyadenosin-5'-diphosphoribose (2dADPR) sowie cyclische ADPR (cADPR).

# 1.2.1 Die Adeninnukleotide ADPR und 2dADPR als TRPM2 Agonisten

Das Molekül ADPR besteht aus einem Adenosin, welches über ein Pyrophosphat mit einer zweiten Ribose verknüpft ist. Es kommt in Zellen natürlicherweise vor (80) und kann beispielsweise durch die Hydrolyse von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) oder von cADPR mittels des multifunktionalen Enzyms CD38 gebildet werden (81, 82).

Für diese Arbeit ist jedoch vor allem von Interesse, dass ADPR ein Agonist des TRPM2 Kanals ist (53). Um allerdings eine ausreichend hohe ADPR-Konzentration in der Zelle zu erreichen, müsste ein erheblicher Anteil des gesamten NAD+ der Zelle zu ADPR hydrolysiert werden (83). Im Kontext der Apoptose, in dem TRPM2 zuerst untersucht wurde, könnte eine derartige Extremsituation z.B. in Folge der Aktivierung des PARP1/PARG-Systems auftreten. Für die Aktivierung des Kanals bei physiologischen außerhalb Vorgängen der Apoptose, z.B. Chemotaxis, erschien dies jedoch unwahrscheinlich.

Im Jahr 2017 wurde der TRPM2 Superagonist 2dADPR entdeckt. Dieses Molekül unterscheidet sich nur durch die Ersetzung einer einzelnen Hydroxygruppe (durch Wasserstoff) am zweiten Kohlenstoffatom der Adenosinribose von ADPR. Es konnte nachgewiesen werden, dass es ebenso wie ADPR mittels CD38 produziert werden kann (aus 2'-Desoxy-NAD) und zudem in der Zelllinie Jurkat (mit endogener TRPM2 Expression) vorhanden ist. Dementsprechend handelt es sich bei 2dADPR um einen weiteren, physiologischen TRPM2 Agonisten (84).

#### 1.2.2 Das Adeninnukleotid cADPR

Im Gegensatz zu ADPR weist cADPR einen Ringschluss über eine N-glykosidische Bindung zwischen dem ersten Stickstoff (N1) des Adenins und dem ersten Kohlenstoff (C1) der terminalen Ribose auf. Dieses cADPR ist als sekundärer Botenstoff im Kontext der Calciumsignale als Calciumionen freisetzender Botenstoff beschrieben worden (85). Die Pharmakologie spricht für eine Wirkung auf den Ryanodinrezeptor, der exakte Mechanismus ist allerdings noch unklar (86).

So erschien die Demonstration, dass cADPR an der Aktivierung von TRPM2 beteiligt sein und auf diese Art zu einem Calciumioneneinstron führen könnte zunächst folgerichtig, als ein Effekt von cADPR auf TRPM2 beschrieben wurde.

Kolisek und Mitarbeiter zeigten, dass cADPR ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M einen synergistischen Effekt mit ADPR besitzt, der die Öffnung des TRPM2 Kanals durch ADPR-Konzentrationen bereits im nanomolaren Bereich erlaubte. Eine Konzentration von 100  $\mu$ M hingegen sorgte auch in Abwesenheit von ADPR für eine messbare Öffnung des Kanals, wenn auch nur sehr kleine Amplituden in der Stromstärke verzeichnet wurden, während eine Konzentration von 1 mM für ein deutliches Signal nötig war (87).

Zudem wurde in derselben Arbeit ein inhibierender Effekt von AMP auf TRPM2 beschrieben (87).

Im darauffolgenden Jahr wurde dieses Phänomen als eine temperaturabhängige Aktivierung erkannt: 100  $\mu$ M cADPR waren bei 25 °C laut Togashi und Kollegen nicht ausreichend, um TRPM2 Kanäle zu aktivieren, in Kombination mit Temperaturen von über 35 °C wurde allerdings beobachtet, dass cADPR TRPM2 aktiviert (88).

Diesen Ergebnissen stand jedoch entgegen, dass gezeigt werden konnte, dass kommerziell erhältliches cADPR bereits zum Teil zu ADPR degradiert vorlag. Die Effekte von cADPR auf TRPM2 wurden daher der ADPR-Verunreinigung zugeschrieben wurden, da 10  $\mu$ M enzymatisch gereinigtes cADPR weder TRPM2 selbst aktivierte, noch einen Effekt auf die Aktivierung durch ADPR zeigte. Allerdings entsteht bei der enzymatischen Reaktion der Pyrophosphatase, die genutzt wurde, um das ADPR in den cADPR-Proben abzubauen, AMP. Sowohl in den Experimenten von Heiner und Kollegen als auch von Tóth und Csanády ließ sich jedoch auch keine Inhibition von TRPM2 durch AMP beobachten (89,90). Diese Beobachtung konnte von Moreau und Kollegen bestätigt werden (91).

Neun Jahre später allerdings kehrte das Interesse an dieser Frage zurück, als in einer EM-Struktur des hTRPM2 das Derivat 8-Br-cADPR (8-Bromo cyclische Adenosin-5'diphosphoribose) nachgewiesen werden konnte, welches sich in der Bindungsstelle in der MHR1/2 Domäne befand (92) und von dem bereits in der ersten Publikation zur Aktivierung von TRPM2 demonstriert wurde, dass es spezifisch die durch cADPR hervorgerufene Aktivierung des Kanals inhibiert, während die Aktivierung durch ADPR nicht durch 8-Br-cADPR inhibiert wird (87). Außerdem wurde erneut die Wirkung von selbst synthetisiertem, nicht kontaminiertem cADPR als TRPM2 Agonist demonstriert. Dabei wurden 500  $\mu$ M cADPR benötigt, um eine deutliche Reaktion bei Raumtemperatur hervor zu rufen, während bei 37°C bereits 10  $\mu$ M ausreichend waren, um TRPM2 zu aktivieren (93).

# 1.3 Methoden zur Untersuchung von TRPM2

Zu Untersuchung von TRPM2 lassen sich unterschiedliche Methoden verwenden. Einerseits kann man die Struktur des Kanals mittels EM oder Röntgenkristallographie untersuchen und so dank des Form-folgt-Funktion-Prinzips einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Kanals leisten. Jedoch handelt es sich dabei um statische Momentaufnahmen, während in dieser Arbeit eher Methoden im Fokus stehen sollen, mit denen sich das Verhalten des Kanals dynamisch im Kontext der Zelle untersuchen lässt.

Dazu gehört die Patch Clamp Methode, bei der der Einstrom von Calciumionen als elektrischer Strom gemessen wird und so die Kanäle in einer einzelnen Zelle untersucht werden können.

Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die ihre Fluoreszenz durch die Bindung von Calciumionen verändern, kann die Veränderung der Calciumionenkonzentration in einzelnen Zellen fluoreszenzmikroskopisch beobachtet oder ein einer Zellsuspension fluorimetrisch detektiert werden.

Dies ist auch mit fluoreszierenden Proteinen möglich. Durch die Fusion eines solchen Proteins an einen Intrabody, eine besondere Art von Antikörper, welcher intrazellulär an ein Epitop binden kann, welches an das Zielprotein angehängt wird, soll hier eine neue Methode zur Untersuchung von TRPM2 entwickelt werden.

# 1.3.1 Patch Clamp Experimente

Bereits im 18. Jahrhundert war bekannt, dass man das Muskelgewebe von kürzlich verstorbenen Tieren mit Elektrizität zur Kontraktion bringen kann (94), womit der Grundstein für das Konzept der Elektrophysiologie gelegt war. Es brauchte allerdings viele technische Weiterentwicklungen, bis es Erwin Neher und Bert Sakmann gelang, die Patch Clamp Methode zu entwickeln (95), und gemeinsam mit ihren Kollegen um die Gigaseal-Technik zu erweitern (96). Erst dadurch wurde es möglich, die winzigen Ströme, die durch die Ionenkanäle von nicht elektrisch erregbaren Zellen fließen, näher zu untersuchen.

Bei Ganzzellableitungen mithilfe der Gigaseal Patch Clamp Technik wird eine puffergefüllte, feine Glaskapillare mit einer Elektrode darin mit leichtem Überdruck sehr nah an die zu untersuchende Zelle gebracht, sodass die Zellmembran durch den ausströmenden Puffer ein wenig eingedrückt wird. Sobald der Überdruck entfernt wird, kehrt die Zellmembran in die Ausgangslage zurück und legt sich an die Öffnung der Kapillare, sodass diese durch die Zellmembran verschlossen ist. In diesem Zustand lässt sich zwischen der intrazellulären Elektrode in der Glaskapillare und der Badelektrode, die sich im umgebenden Medium befindet, ein Widerstand im Bereich von einigen G $\Omega$  messen.

Wird die Zelle dann durch einen kurzen Unterdruck in der Glaskapillare geöffnet, legt sich der zerrissene Teil der Zellmembran innen an die Wände der Kapillare und es entsteht eine

direkte Verbindung zwischen dem Inhalt der Kapillare und dem Inneren der Zelle. Der Widerstand gegenüber der Badlösung bleibt jedoch erhalten.

Die ganze Zellmembran befindet sich damit als Widerstand (und Kapazität) zwischen den beiden Elektroden, und das Verhalten aller Kanäle der Zelle kann somit in der Gesamtheit als Summe der Ströme durch die einzelnen Kanäle gemessen werden (96).

#### 1.3.2 Niedermolekulare Fluoreszenzfarbstoffe

Durch die Entwicklung von Fluoreszenzfarbstoffen, die Calciumionen binden und bei dieser Bindung ihre Fluoreszenzeigenschaften verändern, wurde es möglich, auch sehr geringe Konzentrationen freier Calciumionen, wie sie im Zytosol von Zellen auftreten, fluorimetrisch zu messen. Werden diese Farbstoffe nun chemisch so verändert, dass sie die Zellmembran durchqueren können und erfolgt diese Modifikation bioreversibel, sodass in der Zelle der nicht-membrangängige Farbstoff wieder freigesetzt wird, kann dieser die Zelle nicht wieder verlassen.

In Zellen, die auf diese Art mit Fluoreszenzfarbstoff beladen wurden, lässt sich die Calciumionenkonzentration messen und so auf einen Einstrom oder eine Freisetzung von Calciumionen aus den zellulären Speichern schließen (97).

# 1.3.3 Genetisch codierte Calciumsensoren

Im Jahr 1997 wurde zweimal fast gleichzeitig die Umsetzung der gleichen Idee publiziert: Auf Basis des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und des calciumbindenden Proteins Calmodulin wurden genetisch codierte Calciumindikatoren (genetically encoded calcium indicator, GECI) entwickelt, bei denen die entsprechenden Gene so zusammengestellt wurden, dass das resultierende Fusionsprotein erst durch die Bindung von Calciumionen seine Fluoreszenzeigenschaften erlangt (98, 99).

Auf diese Art wurde es möglich, einen Calciumsensor in Zellen hinein zu klonieren, den diese dann selbst exprimieren, statt sie mit einem Farbstoff zu beladen. In den folgenden Jahren wurden diese Sensoren weiterentwickelt und es entstand eine Palette unterschiedlicher GECIs, die sich beispielsweise in ihren Calciumsensitivitäten und ihren Fluoreszenzspektren unterscheiden. So wurden unter anderem 2011 die Sensoren G-GECO1 und G-GECO1.2 (genetically encoded calcium indicator for optical imaging) publiziert (100). 2014 kamen außerdem die auf den Gebrauch in Organellen hin optimierten CEPIAs (calcium-measuring organelle-entraped protein indicators) hinzu (101).

Diese Art der Calciumsensoren wurde bereits genutzt um Fusionsproteine aus GECI und dem Ionenkanal Orai herzustellen, sodass es möglich wurde, den Calciumeinstrom durch einen einzelnen Orai-Kanal zu beobachten (102).

#### 1.3.4 Nanobodies und Intrabodies

Im Jahr 1890 gelang es Emil von Behring und Shibasabuto Kitasaro, Seren zur Behandlung von Tetanus bei Mäusen zu gewinnen (103) und auf dieser Arbeit basierend gemeinsam mit Paul Ehrlich die Serumtherapie zur Behandlung von Diphterie zu entwickeln (104). Damit waren Antikörper entdeckt, auch wenn die typische, Y-förmige Struktur aus jeweils zwei leichten und zwei schweren Ketten erst Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts aufgeklärt wurde (105, 106).

Diese Struktur war bereits gut etabliert, als überraschend bei der Untersuchung des Immunsystems von Dromedaren eine andere Art von Antikörpern entdeckt wurde: Sogenannte Nanobodies, die ausschließlich aus schweren Ketten bestanden. Auch ohne die variable Domäne der leichten Kette zeigte sich, dass diese Nanobodies an eine Vielzahl möglicher Epitope binden können (107).

Auf Basis von Nanobodies wurde 2019 das ALFA-System entwickelt. Dabei handelt es sich um die Kombination eines speziell angepassten Epitops, des sogenannten ALFA-tags und des Nanobody nbALFA, der dieses Epitop bindet. Die Sequenz des  $\alpha$ -helicalen Epitops (SRLEEELRRRLTE) kommt in den üblichen Modellorganismen nicht vor und wird zudem im vollständigen tag von Prolinen umgeben. Auf diese Art soll es einerseits weder zu Interaktionen mit anderen Proteinen als dem markierten Zielprotein kommen und andererseits soll auch das Einfügen der Sequenz in das Zielproteins dieses in seiner Struktur so wenig wie möglich beeinträchtigen (108).

Während Nanobodys ebenso wie Antikörper physiologisch extrazellulär vorliegen und Nanobodys intrazellulär nicht korrekt gefaltet werden können, ist es im Falle des nbALFA nachgewiesen, dass dieser in eukaryotischen Zellen korrekt gefaltet wird und funktionsfähig ist. Transformiert man dementsprechend ein Plasmid mit der Sequenz, die für den nbALFA codiert in eukaryotische Zellen, wird ein funktionsfähiger, intrazellulärer Nanobody, ein sogenannter Intrabody exprimiert (108).

# 2 Problemstellung

TRPM2 verfügt über eine C-terminale Domäne, die homolog zu dem ADPR hydrolysierenden Enzym NUDT9 aus der Nudix-Familie ist und daher NUDT9H Domäne genannt wird. Anhand dieser Homologie wurde entdeckt, dass der Kanal durch das Adeninnukleotid ADPR aktiviert werden kann (53). Interessanterweise war es jedoch möglich, den TRPM2 Kanal aus der Seeanemone *Nematostella vectensis* auch dann noch zu aktivieren, wenn die NUDT9H Domäne entfernt wurde (68), während eine Punktmutation, die die Nukleotidbindung verhindert sowohl im hTRPM2 als auch drTRPM2 dazu führen, dass diese nicht mehr aktiviert werden können (68, 69).

Zusätzlich wurde allerdings eine zweite Nukleotidbindungsstelle entdeckt, die sich Nterminal in der MHR1/2 Domäne des Proteins befindet und ebenfalls an der Kanalaktivierung beteiligt ist (58).

Um die Bedeutung der beiden Bindungsstellen für die Aktivierung des humanen Kanals durch die Agonisten zu untersuchen, werden in dieser Arbeit Punktmutationen in jeweils einer Bindungsstelle verwendet, und die Aktivierbarkeit der so veränderten Kanäle mittels Patch Clamp Ganzzellableitungen untersucht.

Bei cADPR handelt es sich um ein Adeninnukleotid, das als sekundärer Botenstoff im Kontext der Calciumionensignale bekannt ist (86). Die Aktivierung von TRPM2 durch cADPR wird in der Literatur kontrovers diskutiert (87-93). Zur Untersuchung der Frage, ob cADPR tatsächlich als Agonist für TRPM2 fungieren kann, werden Patch Clamp Experimente durchgeführt. Zudem wird das Derivat 8-Br-cADPR verwendet, welches spezifisch durch cADPR hervorgerufene TRPM2 Aktivierung inhibieren sollte (87).

Patch Clamp Experimente sind in der Regel auf Zellen beschränkt die sich nicht bewegen und Ganzzellableitungen bilden die Summe aller Ströme über die Plasmamembran ab. Die Bestimmung der Calciumionenkonzentration mittels Ca<sup>2+</sup> Imaging ermöglicht im Gegensatz dazu zwar eine räumliche Auflösung von Prozessen innerhalb der Zelle, weist aber auch Calciumionen aus allen Quellen nach und ist insofern nicht spezifisch die Aktivierung von TRPM2. Um diese Limitierungen zu überwinden, soll ein System entwickelt werden, bei dem ein genetisch encodierter Ca<sup>2+</sup> Indikator (GECO) mithilfe eines anti-ALFA-tag Intrabody an TRPM2 Kanäle mit angefügtem ALFA-tag gebunden wird, um so selektiv den Einstrom von Calciumionen durch TRPM2 fluorimetrisch zu messen.

# 3 Material und Methoden

### 3.1 Zellkultur von HEK-293 Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HEK (human embryonic kidney) 293 Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine Zelllinie, die aus humanen, embryonalen Nierenzellen gewonnen und DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5 ausgesetzt wurde, um sie zu transformieren (109).

In der Arbeitsgruppe Calciumsignale wurden diese Zellen mit Expressionsvektoren transfiziert, selektioniert und kloniert, um Zelllinien zu erhalten, die stabil EGFP bzw. TRPM2 und EGFP exprimieren.

Es wurde mit insgesamt vier Zelllinien gearbeitet: Die parentalen HEK-293 Zellen werden zur besseren Unterscheidung im Folgenden als HEK-293-Wildtyp bezeichnet. Die beiden Zelllinien, die sowohl TRPM2 als auch EGFP exprimieren, werden HEK-293 TRPM2 #23 und HEK-293 TRPM2 #24 genannt, wobei HEK-293 TRPM2 #23 eine höhere TRPM2 Expression aufweist als HEK-293 TRPM2 #24. Dadurch eignet sich die Linie HEK-293 TRPM2 #24 besser für Patch Clamp Experimente, während HEK-293 TRPM2 #23 besser für die Ca<sup>2+</sup>-Fluorimetrie geeignet ist. Die Linie HEK-293 EGFP #8 exprimiert EGFP, aber kein TRPM2 und wird als Kontrolle verwendet.

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten.

#### 3.1.1 Auftauen von Zellen

Um Zellen, die in flüssigem Stickstoff cryokonserviert wurden, in Kultur zu nehmen, wurden zunächst pro Aliquot 20 mL Kulturmedium in einem 50 mL Reaktionsgefäß, sowie ein 70 prozentiges Ethanol-Bad im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Anschließend wurden die Aliquots mit den Zellen dem Stickstofftank entnommen und so lange in das vorgewärmte Ethanol-Bad gehalten, bis die gefrorene Zellsuspension an den Kontaktflächen zum Reaktionsgefäß angetaut war. Anschließend wurde der gefrorene Block mit den Zellen unter der sterilen Werkbank in 20 mL vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Auf diese Art gelangten die meisten Zellen noch gefroren in das Medium und das enthaltene DMSO wurde entsprechend schnell verdünnt.

Sobald die Zellen im Medium vollständig aufgetaut waren, wurden sie zentrifugiert (800xg, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Die pelletierten Zellen wurden in 10 mL Kulturmedium resuspendiert, in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (wie oben) und der Überstand erneut verworfen. Dieser Schritt wurde mit weiteren 10 mL Kulturmedium wiederholt und die Zellen final in 8 mL Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zur Kultur in eine T25-Zellkulturflasche gegeben. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt.

Bis zur ersten Passage wurden die Zellen ohne Selektionsantibiotikum inkubiert.

#### 3.1.2 Passage der Zellkultur

Die Konfluenz der Zellen in Kultur wurde vor jeder Passage lichtmikroskopisch geschätzt und die Expression von EGFP in regelmäßigen Abständen fluoreszenzmikroskopisch mit dem EGFP Filtersatz (Anregung bei 488 nm, Emission bei 510 nm) überprüft.

In Abhängigkeit von der angestrebten Konfluenz wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:20 verdünnt.

Bei dem beschriebenen Vorgehen wurden für T25-Zellkulturflaschen kleinere Volumina verwendet als für T75-Zellkulturflaschen, wobei das Volumen für letztere im Folgenden in Klammern angegeben ist.

Das vorhandene Kulturmedium wurde entfernt und verworfen und die Zellen mit 2 mL (4 mL) Trypsin/EGTA inkubiert, bis sie sich leicht ablösen ließen. 8 mL (20 mL) Kulturmedium wurden verwendet, um die Zellen mithilfe der Pipette zusätzlich vom Boden abzuspülen. Anschließend wurde entsprechend der gewünschten Verdünnung ein entsprechender Bruchteil der Zellsuspension in eine frische Zellkulturflasche überführt und mit Kulturmedium auf 8 mL (24 mL) aufgefüllt.

Für die HEK-293-Wildtyp Zellen wurde kein Selektionsantibiotikum verwendet, die Kulturen der Zelllinien EGFP #8, TRPM2 #23 und TRPM2 #24 wurden jeweils mit 400 µg/mL G418 versetzt. Wenn bei der Überprüfung der EGFP-Expression eine geringer werdende Anzahl transfizierter Zellen beobachtet wurde, wurde die Konzentration von G418 für zwei Wochen verdoppelt. Falls weiterhin mehr als wenige Prozent untransfizierter Zellen beobachtet wurde die Klone verworfen und eine neue Probe der Zellen aufgetaut.

In den Fällen, in denen die Zellen nach drei Tagen noch weniger als 50 % konfluent waren, wurde am dritten Tag das Kulturmedium verworfen und durch frisches Medium ersetzt, wobei entsprechend im Fall von EGFP #8, TRPM2 #23 und TRPM2 #24 Selektionsantibiotikum wie oben hinzugegeben wurde.

# 3.1.3 Einfrieren von Zellen

Zu etwa 75% konfluenten Zellen aus zwei T75-Zellkulturflaschen wurden wie oben mithilfe von Trypsin/EDTA abgelöst und in Kulturmedium resuspendiert. Jeweils 10  $\mu$ L der Zellsuspension wurden abgenommen und mit 10  $\mu$ L einer 0,4 prozentigen Trypanblaulösung gemischt. Die Zahl vitaler Zellen wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nachdem die Zellen zentrifugiert (800xg, 5 min, RT) und der Überstand verworfen wurde, wurden sie so in Einfriermedium resuspendiert, dass sich eine Zelldichte von 2·10<sup>6</sup> Zellen pro mL ergab. Die Suspension wurde in Aliquots zu je 1 mL auf Kryo-Gefäße verteilt und bei -80°C eingefroren. Am Folgetag wurden sie in den Stickstofftank überführt. Zwei bis vier Wochen nach dem Einfrieren wurde eine Auftaukontrolle mit einem der Aliquots durchgeführt.

#### 3.1.4 Puffer und Lösungen

- Kulturmedium: DMEM + GlutaMax-I<sup>™</sup> +4,5 g/L D-Glucose ohne Pyruvat (Gibco) mit 10 % FBS Superior (SigmaAldrich) und 100 U/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin (Gibco)
- Einfriermedium: FBS Superior (SigmaAldrich) mit 10 % DMSO (SigmaAldrich)
- Trypsin/EDTA: 0.05% (w/v) Trypsin und 0.02% EDTA (w/v) (Sigma)
- Selektionsantibiotikum G418: G418 BC Sulfat (Merck) 2018-2022 G418 Disulfid Salz (SigmaAldrich) 2022
- Trypanblau 0,4 % (Gibco)

# 3.1.5 Geräte

- Brutschrank: Binder (Tuttlingen)
- Brutschrank: Heraeus (Hanau)
- Zentrifuge: Megafuge 16R Heraeus (Hanau)
- Zentrifuge: Eppendorf centrifuge 5810R (Hamburg)
- Sterile Werkbank: Heraeus (Hanau)
- Sterile Werkbank: BDK NeoLab (Heidelberg)
- Neubauer-Zählkammer: Brand (Mannheim)
- Mikroskop: Axiovert 100, Zeiss (Wetzlar) mit LED-Lichtquelle: sola light engine, AHF Analysentechnik (Tübingen)

# 3.2 Mutagenese mittels QuikChange PCR

# 3.2.1 QuikChange PCR

Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz genutzt:

Menge/Konzentration	Substanz
je 100 µM	dNTPs
0,2 μΜ	forward Primer
0,2 μΜ	reverse Primer
20 ng	Vektor-DNA
2,5 U	Pfu-Turbo-Polymerase

Tabelle 3.1: Reaktionsmischung für Quik Change PCR

Dazu wurden 5  $\mu$ L des Reaktionspuffers gegeben und mit bidestilliertem Wasser auf 50  $\mu$ L aufgefüllt. Der Reaktionsmix wurde bei einer Deckeltemperatur von 105°C in einem Thermocycler mit dem folgenden Programm gestellt:

labene 5.2. i CK i logrammi fui Quik Change i CK			
PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95°C	30 s	
Denaturierung	95°C	30 s	
Annealing	55°C	1 min	
Elongation	68°C	10 min	

Tabelle 3.2: PCR Programm für Quik Change PCR

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße auf 4°C abgekühlt.

# 3.2.2. Modifizierte QuikChange PCR

In der modifizierten QuikChange PCR wurden zwei getrennte Reaktionsansätze genutzt, die jeweils nur einen der Primer enthielten.

Substanz	Mix A	Mix B
dNTPs	je 50 μM	je 50 μM
forward Primer	0,1 μM	
reverse Primer		0,1 μM
Vektor-DNA	200 ng	200 ng
DMSO	2 %	2 %
Pfu-Turbo-Polymerase	1,25 U	1,25 U

Tabelle 3.3: Reaktionsmischung für modifizierte Quik Change PCR

Es wurden 5  $\mu$ L Reaktionspuffer hinzu gegeben und mit bidestilliertem Wasser auf 25  $\mu$ L aufgefüllt. Mix A und Mix B wurden zunächst für 10 Zyklen getrennt bei dem in Tabelle 3.4 beschriebenen Programm gestellt. Anschließend wurden beide Proben zusammen gegeben um einen vollständigen PCR-Ansatz zu erhalten, zu dem zusätzliche 0,625 U Pfu-Turbo hinzugegeben wurden, bevor weitere 18 Zyklen des Programms durchlaufen wurden.

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	2 min
Denaturierung	95°C	30 s
Annealing	55°C	1 min
Elongation	68°C	12 min

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße auf 4°C abgekühlt.

# 3.2.3 Restriktionsverdau

Da im Reaktionsansatz weiterhin die Ausgangsvektoren enthalten waren, mussten diese durch einen Restriktionsverdau abgebaut werden. Dazu wurde die Tatsache genutzt, dass es sich bei dem Ausgangsvektor um methylierte DNA handelt, während das PCR-Produkt unmethyliert ist. Zu jedem PCR-Ansatz wurden daher 10 U des Restriktionsenzyms *Dpn*I gegeben, welches nur methylierte DNA hydrolysiert. Die Mischung wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

# 3.2.4 Transformation in E.coli

Kompetente *E.coli XL1 Blue* wurden kurz in einem Eisbad angetaut. Sobald die Aliquots flüssig waren, wurden 5  $\mu$ L des *Dpn*I verdauten PCR-Ansatzes hinein gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock von 60 s bei 42°C ausgesetzt und anschließend in 37°C warmes SOC-Medium gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C in einem Schüttler mit 150 rpm wurden die Bakterien zentrifugiert (5000xg, 1 min, RT), in 100  $\mu$ L SOC-Medium resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit 30  $\mu$ g/mL Kanamycin ausplattiert.

Nachdem mit dieser Methode kein Koloniebildung beobachtet werden konnte, wurde der Hitzeschock auf 45 s reduziert, die Zellen in nur 500  $\mu$ L SOC-Medium aufgenommen und diese ohne Zentrifugation vollständig ausplattiert.

Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

# 3.2.5 Bakterienkultur

Pro Agarplatte wurden drei 14 mL Reaktionsgefäße mit Schnappdeckel mit 4 mL LB-Medium mit 30µg/mL Kanamycin bereitgestellt. Mittels einer Pipettenspitze, deren Öffnung in einer Flamme zugeschmolzen wurde, wurde jeweils eine Kolonie gepickt und in eines der Röhrchen überführt. Diese wurden über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Eine derartige Bakterienkultur wurde entweder selbst zur Plasmidpräparation verwendet, oder diente als Impfkultur für eine 200 mL Kultur. In diesem Fall wurden die 4 mL der Impfkultur in 200 mL bereitgestelltes LB-Medium mit 30 µg/mL Kanamycin gegeben und ebenfalls über Nacht inkubiert wie beschrieben.

# 3.2.6 Plasmidpräparation

Zur Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNA für die Sequenzierung wurden Minipräparationen mithilfe des Minipräparations-Kits NucleoSpin der Firma Machery Nagel durchgeführt. Dabei wurden die 4 mL einer Bakterienkultur auf zwei 2 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und nach Anweisung des Herstellers bearbeitet.

Um größere Mengen des Plasmids zu gewinnen, wurde stattdessen mit dem Maxipräparations-Kit der Firma Qiagen gearbeitet. Für die Maxipräparation wurden 200 mL Bakterienkultur zum Zentrifugieren auf vier 50 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und nach Anweisung des Herstellers die Plasmid-DNA extrahiert.

Dabei wurden die vier Pellets nach dem ersten Resuspendieren wieder zusammengeführt. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde in bidestilliertem Wasser gelöst und anschließend bei -20°C gelagert.

Um den Erfolg der Reinigung und die Konzentration der DNA zu bestimmen, wurde die optische Dichte (OD) bei 230, 260 und 280 nm gemessen. Anhand des Verhältnisses von OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> wurde die mögliche Verunreinigung der DNA mit Proteinen bestimmt, wobei Werte zwischen 1,8 und 2,0 auf eine ausreichend gereinigte Probe schließen lassen. Das Verhältnis von OD<sub>230</sub>/OD<sub>260</sub> erlaubte eine Einschätzung von Verunreinigungen durch kleinere, organische Moleküle, wobei hier Werte zwischen 1,8 und 2,2 akzeptiert wurden. Sofern die Probe keine derartigen Verunreinigungen enthielt, konnte die OD<sub>260</sub> zur Bestimmung der DNA-Konzentration genutzt werden.

### 3.2.7 Puffer, Lösungen und Kits

- Pfu-Polymerase: Pfu Turbo (Agilent Technologies)
- 10x Reaktionspuffer (Agilent Technologies)
- dNTP-Mix (Thermo Scientific)
- DMSO (Sigma)
- *Dpn*I (Thermo Scientific)
- SOC-Medium: LB Medium mit 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 20 mM Glucose, pH 6,8 bis 7
- LB-Medium (Roth)
- LB-Agar (Roth)
- Kanamycin (Roth)
- Minipräparations-Kit: NucleoSpin Plasmid (Machery Nagel)
- Maxipräparations-Kit: Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
- Primer (Eurofins Genomics) R302A fw: 5'-CTT CTC CAG CCT GGT CGC CAG AGG AAT CTC CAC C-3' R302A rev: 5'-GGT GGA GAT TCC TCT GGC GAC CAG GCT GGA GAA G-3' R358A fw: 5'-CGT CGG CCA CGG CGC CCG AGC CCT-3' R358 A rev: 5'-AGG GCT CGG GCG CCG TGG CCG ACG-3'

#### 3.2.8 Geräte

- PCR Gerät: eppendorf Mastercycler personal (Hamburg)
- Tischzentrifuge: VWR Micro Star 17R (Radnor, USA)
- Tischschüttler: eppendorf Thermomixer compact (Hamburg)
- Tischschüttler: eppendorf Thermomixer 5436 (Hamburg)
- Brutschrank: WBT Binder (Tuttlingen)
- Bakterienschüttler: Unitron, Infors HT (Bottmingen, Schweiz)
- NanoDrop: Thermo Scientific (Waltham, USA)

#### 3.3 Herstellung kompetenter Bakterien

#### 3.3.1 Herstellung kompetenter E.coli XL1 Blue

Ein Aliquot von *E.coli XL1 Blue*, die bei -80°C gelagert wurden, wurde einmal mit einer Pipettenspitze, deren Öffnung in einer Flamme zugeschmolzen wurde, berührt, und diese anschließend auf einer LB-Agarplatte mit 12,5  $\mu$ g/mL Tetracyclin ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Eine Kolonie wurde gepickt und in 4 mL LB-Medium mit 12,5  $\mu$ g/mL Tetracyclin über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde anschließend in ein 100 mL LB-Medium mit Tetracyclin wie oben überführt und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Sobald eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht war, wurde die Bakteriensuspension für 15 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (1000xg, 15 min, 4°C) und in 33,4 mL Puffer RF-1 resuspendiert. Inkubation auf Eis und Zentrifugation wurden wiederholt. Die Bakterien wurden anschließend in 8 mL Puffer RF-2 resuspendiert und zügig in 100  $\mu$ L Aliquots aufgeteilt, welche bei -80°C gelagert wurden.

#### 3.3.2 Puffer und Lösungen

- LB-Agar (Roth)
- LB-Medium (Roth)
- Tetracyclin (Roth)
- Puffer RF-1: 100 mM RbCl, 30 mM KaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin, pH 5,8 (mit Essigsäure)
- Puffer RF-2: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin, pH 6,8 (mit Essigsäure)

# 3.3.3 Geräte

- Brutschrank: WBT Binder (Tuttlingen)
- Bakterienschüttler: Unitron, Infors HT (Bottmingen, Schweiz)
- Zentrifuge: Megafuge 16R Heraeus (Hanau)

#### 3.4 Oberflächenbiotinylierung zum Nachweis von TRPM2 in der Plasmamambran

### 3.4.1 Transfektion von HEK-239 Zellen

Pro Transfektionsansatz wurde eine T25-Zellkulturflasche verwendet, die so vorbereitet war, dass sie am Tag der Transfektion etwa 80 % Konfluenz der HEK-293-Wildtyp Zellen aufwies. Das Medium in den Flaschen wurde gegen frisches Kulturmedium ohne Antibiotika ausgetauscht. Je Probe wurden 1,5 mL Opti-MEM mit 6  $\mu$ L PLUS-Reagenz und 7,5  $\mu$ g des zu transfizierenden Vektors angesetzt, gut gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 18  $\mu$ L LTX-Reagenz hinzugegeben, erneut gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Mischung für 6 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> zu den Zellen gegeben, bevor das Medium durch normales Kulturmedium ersetzt wurde und die Zellen für weitere 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden. Anschließend wurde der Erfolg der Transfektion anhand der EGFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

# 3.4.2 Oberflächenbiotinylierung

Zunächst wurde die Biotinylierungslösung vorbereitet, indem die EZ-Link Sulfo NHS-LC-Biotin in DPBS (mit CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>) auf 1 mg/mL verdünnt wurde. Zudem wurde auch eine 2 mM EDTA-Lösung in PBS (ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>) hergestellt.

Das Kulturmedium der transfizierten Zellen wurde verworfen und die Zellen vorsichtig dreimal mit je 5 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 2 mL der Biotinylierungslösung für 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt.

Der Überstand aus den Zellkulturflaschen wurde entnommen und zentrifugiert (500xg, 5 min, RT) um Zellen, die sich während der Biotinylierung abgelöst haben, zu sammeln. Der Überstand der Zentrifugation wurde verworfen.

Währenddessen wurden die adhärenten Zellen, die in der Zellkulturflasche verblieben waren mit 2 mL der EDTA-Lösung behandelt, um sie vorsichtig vom Flaschenboden abzulösen. Die so erhaltene Zellsuspension wurde zu den zuvor gesammelten Zellen gegeben.

Dieser Schritt wurde wiederholt, um weitere Zellen vom Flaschenboden zu lösen und der Probe hinzuzufügen. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit je 2 mL der EDTA-Lösung gewaschen.

#### 3.4.3 Extraktion der Membranproteine

Im folgenden Schritt wurden die Membranproteine mithilfe eines kommerziell erhältlichen Kits unter Erhalt ihrer Konformation aus der Membran extrahiert. Dazu wurden die Puffer des ProteoExtract<sup>®</sup> Native Membrane Protein Extraction Kits auf Raumtemperatur gebracht und durchmischt, Wasch- und Extraktionspuffer anschließend auf Eis gestellt. Die Zellpellets wurden zweimal mit Waschpuffer gewaschen, bevor zunächst 10  $\mu$ L Protease-Inhibitor-Mix und anschließend sofort 2 mL Extraktionspuffer I hinzugegeben wurden, in denen das Pellet resuspendiert wurde.

Die Proben wurden im Kühlkabinett für 10 min bei 20 U/min im Rotationsmischer inkubiert

und dann zentrifugiert (13 000xg, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und es wurden 5  $\mu$ L Protease-Inhibitor-Mix und 500  $\mu$ L Extraktionspuffer hinzugegeben. Die resuspendierten Pellets wurden 30 min wie oben im Rotationsmischer inkubiert.

Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation (13 000xg, 10 min, 4°C), die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt.

#### 3.4.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde eine Standardreihe mit je 5  $\mu$ L einer BSA-Lösung in den Konzentrationen 1  $\mu$ g/ $\mu$ L; 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L; 0,25  $\mu$ g/ $\mu$ L und 0,125  $\mu$ g/ $\mu$ L in Extraktionspuffer II angesetzt, sowie eine leere Probe ohne BSA.

Sowohl diese Standardreihe, als auch Duplikate der 1:10 verdünnten Proben, wurden auf einer 96-well-Platte mit je 250  $\mu$ L Bradford-Reagenz gemischt und nach 10 min die Absorption bei 595 nm gemessen. Anhand einer so erstellten Eichkurve wurde die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt. Jeweils 20  $\mu$ g dieses Gesamtproteins pro Probe wurden zur späteren Verwendung eingefroren.

#### 3.4.5 Isolation der biotinylierten Proteine

Das nach dem Abnehmen der Extraktionsprobe verbliebene Protein (je 480  $\mu$ g aus den mit EGFP und den mit TRPM2-wt transfizierten Zellen, 440  $\mu$ g aus den Zellen, die mit der Mutante R1404Q transfiziert worden sind und 350  $\mu$ g aus den Zellen, die mit der Doppelpunktmutante R302A/R358A transfiziert worden sind) 100  $\mu$ L NeutraVidin Agarose Kügelchen (50 % Mischung mit wässriger Trägerflüssigkeit) gemischt und über Nacht im Kühlkabinett bei 20 U/min im Rotationsmischer inkubiert.

Am Folgetag wurden die Proben zentrifugiert (2500xg, 2 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet entweder zur späteren Verwendung eingefroren oder sofort zusammen mit der eingefroren Gesamtprotein-Proben weiter verwendet.

#### 3.4.6 SDS-PAGE

Die acht Proben (jeweils eine Probe der gesamten Membranextraktion und eine der isolierten, biotinylierten Proteine von jeder der vier Transfektionen) wurden mit der zum Volumen passenden Menge 4x Probenpuffer gemischt und für 7 min bei 75°C inkubiert. Anschließend wurden Proben mit Agarosekügelchen wie oben zentrifugiert, der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und die Kügelchen im Pellet verworfen. Um die Proben aufzutrennen, wurden je 25  $\mu$ L der Probe in die Taschen eines 4-15 prozentigen Precast Polyacrylamidgels in Laufpuffer gegeben. Zur Bestimmung der Größe der jeweiligen Bande wurden zudem 6  $\mu$ L Marker in eine weitere Tasche pipettiert. Die Proteine wurden mit einer angelegten Spannung von 200 V getrennt, bis die blaue Farbbande unten aus dem Gel heraus gelaufen ist (ca. 40 min). Anschließend wurde das Gel entnommen und die Stege zwischen den Taschen abgetrennt.

#### 3.4.7 Western Blot

Frischer Transferpuffer wurde aus 100 mL 10x Westernblot-Puffer, 200 mL Methanol und 700 mL Wasser hergestellt. Die Blotmembranen wurden mit Bleistift beschriftet, für 30 s luftblasenfrei in 30 mL Methanol eingetaucht und für 15 min in Wasser geschwenkt. Der Kammereinsatz wurde in einer puffergefüllten Schale wie folgt befüllt:

Auf die helle Seite des Kammereinsatzes wurde ein puffergetränkter Schwamm gelegt, darauf zwei Lagen puffergetränktes Filterpapier, die Blotmembran und das Gel, zwei weitere Lagen puffergetränktes Filterpapier und ein zweiter, puffergetränkter Schwamm. Nach jedem aufgelegten Bestandteil wurden eventuell aufgetretene Luftblasen heraus gewalzt. Nachdem der gefüllte Einsatz zugeklemmt in die Kammer eingesetzt wurde, wurde diese mit einem Kühlakku und Laufpuffer gefüllt und in ein Eisbad gestellt. Der Blot wurde über eine Stunde bei 400 mA durchgeführt, anschließend die Membran vorsichtig herausgenommen und das Gel verworfen.

Die Membran wurde für 2 min in Ponceau S Lösung gelegt und auf dem Schwenktisch 2x mit wenig Wasser entfärbt.

Auf Höhe der 140 kDa Markerbande des pre-stained Markers wurde die Membran horizontal in zwei Abschnitte geteilt. Im oberen Membranabschnitt wurde auf der Höhe, die einer Proteingröße von 170 kDa entspricht, TRPM2 erwartet, während sich im unteren Abschnitt auf der Höhe, die einer Proteingröße von 100 kDa entspricht, die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase befinden sollte.

Frische Blockierlösung (2,5 g Magermilchpulver in 50 mL TBS-T) wurde hergestellt, ebenso wie die Primärantikörper-Lösungen. Für letztere wurde  $\alpha$ -TRPM2-Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 000 in 10 mL Blockierlösung gegeben, beziehungsweise  $\alpha$ -Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase -Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000.

Die entsprechenden Membranteile wurden jeweils in 10 mL Blockierlösung für eine Stunde inkubiert, dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen und anschließend in 10 mL der Primärantikörperlösung gegeben und über Nacht im Kühlkabinett geschwenkt.

Am folgenden Tag wurde die Lösung verworfen und die Membranen drei Mal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Währenddessen wurde die Sekundärantikörperlösung hergestellt, indem  $\alpha$ -Kaninchen HRP (Meerrettichperoxidase)-konjugierter Sekundärantikörper 1:10 000 in 10 mL Blockierlösung pro Membran verdünnt wurde. Anschließend wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt und erneut drei Mal mit TBS-T gewaschen.

Pro Membran wurden 450  $\mu$ L SuperSignal West Dura Chemilumineszenzsubstrat mit 25  $\mu$ L SuperSignal West Pico Chemilumineszenzsubstrat gemischt und für 5 min auf die Membran gegeben. Es wurde zunächst ein Bild des Markers aufgenommen anschließend einmal pro Minute die Lumineszenz detektiert.

# 3.4.8 Puffer, Lösungen und Kits

- Kulturmedium: DMEM + GlutaMax-I<sup>TM</sup> +4,5 g/L D-Glucose ohne Pyruvat (Gibco) mit 10 % FBS Superior (Sigma), 100 U/ml Penicillin, 50 μg/ml Streptomycin (Gibco)
- Trypsin/EDTA: 0.05% (w/v) Trypsin und 0.02% EDTA (w/v) (SigmaAldrich)
- Opti-MEM (Invitrogen)
- Lipofektamin LTX und PLUS Reagenz (Invitrogen)
- EZ-Link Sulfo NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific)
- DPBS mit CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> (Gibco)
- PBS ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> (Gibco)
- EDTA (Sigma)
- BSA (SigmaAldrich)
- Bradford-Reagenz (SigmaAldrich)
- 6x SDS-Probenpuffer: 350mM Tris, pH 6,8 mit 30 % (v/v) Glycerol, 10 % (w/v) SDS, 0,5 M DTT, 0,0012 % Bromphenolblau in bidestilliertem Wasser
- Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,4 % SDS
- Marker: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific)
- Precast Gel: Mini Protean TGX Gels, 4-15 % (Biorad)
- ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit (Calbiochem)
- PVDF-Membran Immobilon-P (Merck)
- Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,025 % SDS, 20 % Methanol
- TBS: 50 mM Tris, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 8,0
- TBS-T: 0,05 % Tween20 in TBS
- Blockierlösung: 5 % Magermilchpulver (Roth) in TBS-T
- α-TRMP2-Antikörper: Polyklonaler Antipeptid-Antikörper aus Kaninchen (NB 500-241, Novus Biologicals)
- *α*-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-Antikörper aus Kaninchen (#3010, Cell Signalling Technology)
- *α*-Kaninchen HRP-konjugierter Antikörper aus Ziege (Dianova #111-035-045, Jackson Immunochemicals)
- Supersignal West Dura Chemilumineszenzsubstrat (#34087, Thermo Scientific)
- Supersignal West Pico Chemilumineszenzsubstrat (#37071, Thermo Scientific)
- Vektoren:
- pIRES-EGFP2-hTRMP2-wt (wildtyp, zur Verfügung gestellt von Ralf Fliegert, Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf)

pIRES2-EGFP-hTRPM2-R1404Q (zur Verfügung gestellt von Ralf Fliegert) pIRES2-EGFP (zur Verfügung gestellt von Ralf Fliegert)

pIRES2-EGFP-hTRPM2-R302A-R358A (Mutagenese von pIRES2-EGFP-hTRPM2-wt durch Eurofins Genomics)
## 3.4.9 Geräte

- Brutschrank: Heraeus (Hanau)
- Mikroskop: Axiovert 100, Zeiss (Wetzlar) mit sola light engine, AHF Analysentechnik (Tübingen)
- Schwenktisch: IKA Labortechnik KS250 basic (Staufen)
- Mikrotiterplattenphotometer: Tecan Infinite M Plex (Männedorf, Schweiz)
- Rotationsmischer: Phoenix Instrument RS-TR05 (Garbsen)
- Zentrifuge: Megafuge 16R Heraeus (Hanau)
- SDS Kammer Biorad (Hercules, USA)
- Western Plot Kammer Biorad (Hercules, USA)
- Energiequelle: Biorad Power Pac 200 (Hercules, USA)
- Detektionssystem: GE Healthcare Image Quant LAS4000 (Chicago, USA)

## 3.5 Patch Clamp Experimente

## 3.5.1 Transfektion von HEK-293 Zellen mit JetPEI

Für jeden Transfektionsansatz wurde 1 µg Vektor-DNA in einem Reaktionsgefäß mit 125 µL NaCl-Lösung gemischt. Zudem wurde ein weiteres Reaktionsgefäß mit 5 µL JetPEI Reagenz und 125 µL NaCl-Lösung pro Ansatz vorbereitet. Alle Reaktionsgefäße wurden gemischt und durch kurzes Zentrifugieren an den Boden des Reaktionsgefäßes gebracht. 125 µL der JetPEI/NaCl-Mischung wurden zu jedem Vektor-Ansatz gegeben. Die Transfektionsansätze wurden gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Währenddessen wurde von einer T25-Flasche mit HEK-293-Wildtyp-Zellen das Medium abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden mit 2 mL Trypsin/EGTA abgelöst und in 8 mL Kulturmedium ohne Antibiotika resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (800xg, 5 min, RT), der Überstand verworfen und die Zellen in 5 mL Kulturmedium ohne Antibiotika resuspendiert.

10  $\mu$ L der Zellsuspension wurden mit 10  $\mu$ L Trypanblau gemischt und mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Pro Transfektionsansatz wurden vier 35 mm Zellkulturschalen verwendet, in die jeweils 1 mL Kulturmedium ohne Antibiotika vorgelegt wurde. Anschließend wurden  $2,5\cdot10^5$  Zellen zu jedem der inkubierten Transfektionsansätze gegeben. Diese wurden mit Kulturmedium ohne Antibiotika auf ein Volumen von 1250 µL aufgefüllt und vorsichtig gemischt.

Jeweils 300  $\mu$ L der Zellsuspension wurden mithilfe der Pipette möglichst gleichmäßig in einer Zellkulturschale verteilt. Anschließend wurden die Schälchen in den Inkubator gestellt und über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

## 3.5.2 Patch Clamp Ganzzellableitungen

Die für die Patch Clamp Experimente benötigten Pipetten wurden jeweils vor den entsprechenden Experimenten aus Rohlingen aus Borosilikatglas (1,05x1,50x80 mm) gezogen. Das dazu nötige Programm wurde bei einem Wechsel des Filaments, veränderter Luftfeuchtigkeit oder anderen, äußeren Umständen entsprechend angepasst, sodass Patchpipetten mit einem Widerstand von 1,5 bis 3,5 M $\Omega$  erhalten wurden.

Zur Vorbereitung der intrazellulären Elektrode, eines Silberdrahts, wurde dessen Spitze täglich vor Beginn der Experimente mit Schleifpapier vorsichtig von Rückständen befreit, bis sie glänzte. Etwas Silberchlorid wurde in einem Keramikschiffchen geschmolzen und die angeschliffene Spitze kurz hinein getaucht, um sie mit Silberchlorid zu überziehen.

Vorbereitete Zellen in einer 35 mm Zellkulturschale wurden zweimal hintereinander mit jeweils 1 mL steril filtrierter Extrazellulärlösung gewaschen und anschließend für eine Stunde in 1,5 mL Extrazellulärlösung für die Experimente verwendet.

Die Zellkulturschale wurde auf den Kreuztisch des Fluoreszenzmikroskops im Lichtweg platziert und die Badelektrode, ein Silberchlorid-Pellet, so hinein gehängt, dass sie nicht mit dem Boden oder Rand des Schälchens in Kontakt geraten konnte.

Für Versuche bei 37°C wurde ein Reaktionsgefäß mit 50 mL Extrazellulärlösung bereitgestellt und der erste Ansaugschlauch der Flüssigkeitspumpe hinein geführt. Die Flüssigkeit wurde durch den Schlauch gepumpt, der durch ein Heizelement (Inline Heater) in die Zellkulturschale geführt wurde, sodass ständig vorgewärmte Extrazellulärlösung in die Zellkulturschale nachfließen konnte. Zudem wurde ein durch einen Thermostaten kontrollierter, beheizbarer Einsatz für den Objekttisch des Mikroskops verwendet. Mit einem Temperaturfühler wurde die tatsächliche Temperatur der Flüssigkeit in der Zellkulturschale überwacht und gegebenenfalls am Thermostat des Heizeinsatzes nachjustiert. Der zweite Ansaugschlauch der Pumpe führte aus der Zellkulturschale hinaus in ein Abfallgefäß, sodass der Schale gleiche Volumina der Extrazellulärlösung zu- wie abgeführt wurden.

Für Messungen bei Raumtemperatur wurde keine Badperfusion verwendet, die Zellen verblieben für eine Stunde in der Extrazellulärlösung.

Die Zellen für die Messung wurden nach ihrer Morphologie ausgewählt: Es wurden jeweils einzeln liegende Zellen verwendet, die noch nicht begonnen hatten, sich von der Schale abzulösen und keine längeren Fortsätze hatten, die sie eventuell mit anderen Zellen verbinden könnten. Zudem wurden außergewöhnlich große sowie außergewöhnlich kleine Zellen im Vergleich zu den anderen Zellen der Probe gemieden. Bei Experimenten mit frisch transfizierten Zellen wurde zudem die Expression von EGFP mittels Fluoreszenz überprüft. Dieser Schritt war bei Experimenten mit der stabil transfizierten Zelllinie HEK-293 TRPM2 #24 nicht erforderlich.

Eine Patchpipette wurde mit Intrazellulärlösung, gegebenenfalls mit der gewünschten Konzentration an Nukleotiden befüllt, indem zunächst mit einer 5 mL Spritze und einem Schlauch eine kleine Menge in die Spitze der Pipette gezogen wurde, und anschließend 5  $\mu$ L mithilfe einer langen Gelbeladungsspitze auf einer 0,5-10 $\mu$ L Mikropipette möglichst nah an

die Spitze der Patchpipette gegeben wurde. Meist befand sich dadurch etwas Luft zwischen der Flüssigkeit in der Spitze und in der restlichen Patchpipette, die durch Anschnippen der Patchpipette entfernt wurde.

Die gefüllte Patchpipette wurde über die intrazelluläre Elektrode in den Pipettenhalter eingesetzt, sodass die Elektrode sich in der Flüssigkeit befand. Anschließend wurde ein wenig Luft durch einen Schlauch in das System geblasen und mittels eines Dreiwegehahns eingeschlossen, sodass ein Überdruck in der Patchpipette entstand.

Die Patchpipette wurde mithilfe des Mikromanipulaturs in die Extrazellulärlösung getaucht und durch einen Testpuls der Widerstand der Pipette überprüft. Unter Sichtkontrolle im Mikroskop bei Durchlicht wurde die Pipette an die ausgewählte Zelle heran gebracht, bis eine konkave Verformung der Zelloberfläche zu erkennen war. Durch die Öffnung des Dreiwegehahns wurde der Überdruck in der Pipette abgelassen und die Zellmembran konnte zurückschnellen und sich an die Spitze der Pipette legen. Der dichte Abschluss zwischen Zellmembran und Pipette wurde mithilfe des gemessenen Widerstands überprüft. Dieser musste mindestens 1 G $\Omega$  betragen. Wenn dies nicht der Fall war, konnte durch vorsichtiges Saugen an dem Schlauch das Gigaseal teilweise dennoch erreicht werden. War dies nicht der Fall wurde die Zelle verworfen und eine andere Zelle mit einer neuen Patchpipette angesteuert.

Im Falle eines erfolgreichen Gigaseals wurde die Zelle durch einen Saugpuls geöffnet und eine Ganzzellableitung gestartet. Dabei wurde ein Haltepotential von -50 mV an die Zelle angelegt. Alle 5 Sekunden wurde jeweils eine Spannungsrampe von -85 mV bis +20 mV über eine Dauer von 140 ms durchgeführt und die Stromstärke über den Verlauf dieser Rampe gemessen. Insgesamt wurden 90 dieser Rampen an einer Zelle durchgeführt, sodass die Gesamtdauer der Messung 450 s betrug.

Um die Veränderung der Fluoreszenz einer Zelle während einer Messung aufzuzeichnen, wurde die Pipette unter Sichtkontrolle bei Durchlicht oberhalb der Zelle platziert. Anschließend wurde der Fluoreszenzfilter im Mikroskop eingeschoben, um die Fluoreszenz bei 488 nm anzuregen und die Emission bei 510 nm zu messen. Die Sicht wurde vom Okular auf die Kamera umgestellt und scharf gestellt. Die Pipette wurde mit dem Mikromanipulator vorsichtig abgesenkt, dabei wurde der Pipettenwiderstand kontrolliert. Wenn dieser sich änderte, wurde der Überdruck entfernt und versucht, ein Gigaseal herzustellen. Sofern dies gelang, wurde die Kamera gestartet, die Zelle geöffnet und die Rampenmessung gestartet. Für das Video wurde ein Bild pro 0,7 s aufgenommen.

## 3.5.3 Statistische Auswertung

Unter den gewählten Ionenbedingungen (Ersatz von Na<sup>+</sup> in der Badlösung durch NMDG<sup>+</sup> für das TRPM2 impermeabel ist), zeigt TRPM2 eine charakteristische nicht-lineare IV-Kurve. Dabei sind die Ströme bei positiven Potentialen deutlich größer als bei negativen Potentialen. Um die verschiedenen Konditionen miteinander zu vergleichen und statistische Tests durchzuführen wurde jeweils die maximale Stromstärke bei +15 mV im Verlauf der Messung mit 90 Rampen ausgewertet. Im Text angegeben wird jeweils der Mittelwert der gemessenen Stromstärken und der Standardfehler des Mittelwerts.

Da die Stromstärke in der Regel eine schiefe Verteilung aufweist, die stärker zu höheren Werten streut, wurden die Werte log-transformiert und anschließend auf Normalverteilung geprüft.

Zur statistischen Auswertung normalverteilter Daten wurde die ANOVA verwendet und die einzelnen Gruppen mittels t-Tests mit Bonferroni-Korrektur gegeneinander getestet.

Da unter bestimmten Pufferbedingungen auch nicht-normalverteilte Daten gemessen wurden, bei denen die maximalen Stromstärken sich in zwei Populationen einteilen ließen, wurde der Exakte Test nach Fischer verwendet, um die Verteilung der beiden Populationen (reagierende und nicht reagierende Zellen) zu testen. Zur Auswertung von Unterschieden zwischen den Reaktionen dieser Zellen auf unterschiedliche Nukleotide wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn Korrektur verwendet.

## 3.5.4 Puffer und Lösungen

- Intrazellulärlösung: 120 mM KCl, 8 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5,6 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, pH 7,2 Endkonzentration von freien Calciumionen (berechnet mit MaxChelator) beträgt 200 nM bei RT
- Intrazellulärlösung (37°C): 120 mM KCl, 8 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5,947 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, pH 7,43 bei RT (entspricht pH 7,2 bei 37°C) Endkonzentration von freien Calciumionen (berechnet mit MaxChelator) beträgt 200 nM bei 37°C
- Intrazellulärlösung (nominell calciumfrei): 129,2 mM KCl, 8 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 100 μM EGTA, pH 7,2
- Extrazellulärlösung: 140 mM NMDG, 5 mM KCl, 3,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,4
- Extrazellulärlösung (37°C): 140 mM NMDG, 5 mM KCl, 3,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5,6 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,63 bei RT (entspricht pH 7,4 bei 37°C)
- Extrazellulärlösung (NaCl basiert): 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 3,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,4
- ADPR (SigmaAldrich)
- 2dADPR (Biolog)
- cADPR (Biolog)
- 8-Br-ADPR (Biolog)
- 8-Br-cADPR (Biolog)
- IDPR (Biolog)

- IDPR (zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Barry V.L. Potter, Department of Pharmacology, Oxford University, UK)
- cIDPR (Biolog)
- Kulturmedium ohne Antibiotika: : DMEM + GlutaMax-™ +4,5 g/L D-Glucose ohne Pyruvat (Gibco) mit 10 % FBS Superior (Sigma)
- Trypsin/EDTA: 0.05% (w/v) Trypsin und 0.02% EDTA (w/v) (Sigma)
- Trypanblau 0,4 % (Gibco)
- JetPEI Lösung (Polyplus)
- JetPEI NaCl (Polyplus)
- Vektoren:

pIRES2-EGFP-hTRMP2-wt (zur Verfügung gestellt von Ralf Fliegert) pIRES2-EGFP-hTRPM2-R1404Q (zur Verfügung gestellt von Ralf Fliegert) pIRES2-EGFP-hTRPM2-R302A-R358A (Mutagenese von pIRES2-EGFP-hTRPM2-wt durch Eurofins Genomics) pBI-CMV1-ALFA-hTRPM2 (linker N-terminal) nb-ALFA-G-GECO1.2 (zur Verfügung gestellt von Frederike Kulow, Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) pBI-CMV1-ALFA-hTRPM2 (linker C-terminal) nb-ALFA-G-GECO1.2 (zur Verfügung gestellt von Frederike Kulow) pBI-CMV1-ALFA-hTRPM2 (ohne tag) nb-ALFA-G-GECO1.2 (zur Verfügung gestellt von Frederike Kulow)

## 3.5.5 Geräte

- Mikromanipulator: eppendorf Injectman 4 (Hamburg)
- Verstärker: HEKA EPC10 USB (Reutlingen)
- Mikroskop: Axiovert 100, Zeiss (Wetzlar) mit sola light engine, AHF Analysentechnik (Tübingen)
- Mikroskop: Leica DMi8 (Wetzlar)
- Pumpe: minipuls 2, Gilson (Limburg-Offheim)
- Durchlauferhitzer: Multirchannel Systems PH01 Perfusion Cannula (Wetzlar)
- Wärmeelement: Warner Instruments (Holliston, USA)
- Schwingungsgedämpfter Tisch: AMETEK TMC Cleantop (Berwyn, USA)
- PatchMaster Software: HEKA v2x32 und v2x90 (Reutlingen)
- Rohlinge aus Borosilikatglas, 1,05x1,50x80 mm: Science Products (Hofheim)

## 3.6 Reverse Phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Um zu überprüfen, ob die Nukleotide mit anderen Stoffen, die ebenfalls bei 260 nm UV-Licht absorbieren, verunreinigt waren, wurden sie mittels HPLC (high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) aufgetrennt und die UV-Absorption detektiert.

## 3.6.1 HPLC

Je 5 nmol der zu untersuchenden Nukleotide wurden in das 1200 Infinity System mit einer C-8 Luna Phenomenex Säule (reverse Phase) mit den Abmessungen 250 mm x 4,6 mm und einer Partikelgröße von 5 $\mu$ M gegeben. Die mobile Phase bestand aus 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bei pH 6,0 und floss mit einer Rate von 0,8 mL/min durch die Säule. Von Minute 5 bis Minute 27 wurde der KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer graduell durch Methanol ersetzt.

Nach der Auftrennung wurde die Absorption der von der Säule geflossenen Lösung bei 260 nm gemessen. Die Chromatogramme wurden mittels ChemStation Software analysiert um die Nukleotide zu detektieren.

3.6.2 Puffer und Lösungen

- Kaliumhydrogenphosphat KH2PO4 (Sigma-Aldrich)
- Methanol (Merck)

## 3.6.3 Geräte

- HPLC: 1200 Infinity System (Agilent Technologies, Waldbronn)
- Säule: C-8 Luna Phenomenex, 250 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 5 μM (Phenomenex, Torrance, USA)
- Analysesoftware: ChemStation Revision C.01.05 (Agilent Technologies, Waldbronn)

# 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit soll die Bedeutung der beiden Nukleotidbindungsstellen in der MHR1/2 und der NUDT9H Domäne untersucht werden. Dazu werden Mutanten verwendet, die die Bindung der Nukleotide an die Bindungsstellen verhindern.

Zudem wird die seit Jahren in der Literatur umstrittene Funktion von cADPR als TRPM2 Agonist untersucht. Im Rahmen dieser Experimente wird auch der Antagonist 8-Br-cADPR verwendet, der als spezifischer Antagonist beschrieben ist, der die Aktivierung des Kanals durch cADPR, nicht jedoch durch ADPR inhibiert.

Zudem wird eine neue Methode etabliert, bei der durch die Fusion eines GECO an einen Intrabody, der einen an TRPM2 angehängten tag bindet, die fluorimetrische Messung des Calciumioneneinstroms durch TRPM2 ermöglicht wird.

## 4.1 Die Rolle der Nukleotidbindungsstellen für die Aktivierung von TRPM2

## 4.1.1 Erstellung einer MHR1/2 Mutante

Zur Erstellung der Doppelpunktmutante R302A/R358A wurde zunächst versucht, beide Mutationen einzeln einzuführen, um im Falle einer erfolgreichen Mutagenese das Plasmid mit der gewünschten Mutation anschließend einer zweiten Mutagenese zu unterziehen und so beide Mutationen in einem Plasmid zu erhalten. Dabei wurden verschiedene PCR-Bedingungen erfolglos getestet.

In einem Ansatz wurde die PCR wie folgt durchgeführt: 2 % DMSO, 2 min Initialer Denaturierung bei 95 °C, 30 s Denaturierung, ebenfalls bei 95 °C, 1 min Annealing bei 55 °C und 12 min Elongation bei 68 °C über 10 Zyklen, anschließendes Zusammengeben der beiden Ansätze mit forward und reverse Primer und eine Fortsetzung für weitere 18 Zyklen. Das unter diesen Bedingungen gewonnene und *Dpn*I verdaute Produkt mit den Primern für die R302A Mutation führte nach der Transformation in *E. coli XL1 Blue* zu vier Kolonien, die zur Gewinnung von Plasmiden genutzt werden konnten. Die Sequenzierung durch Eurofin Genomics ergab, dass ein Klon keine Mutation trug, während die drei anderen Klone zwar Mutationen trugen, allerdings nicht die erwünschte, bei der das Codon AGG zu GCC geändert werden sollte.

Bei einem der drei Plasmide lag jedoch stattdessen eine Mutation von 1544-1546 AGG zu GCG vor.

Mithilfe der GenScript Codon Usage Frequency Table (111), einer für unterschiedliche Spezies zur Verfügung stehenden Übersicht über die Verwendungshäufigkeit unterschiedlicher Codons ergab sich, dass das Originale AGG für 20 % der Arginine codiert. Das geplante Codon GCC ist das Codon, das mit 40 % der codierten Alanine beim Menschen am häufigsten für diese Aminosäure codiert. Das tatsächlich in der Mutation vorhandene Codon GCG codiert zwar nur 11 % der Alanine, und ist damit ein seltener genutztes Codon, steht allerdings der Häufigkeit des Originals näher als die ursprünglich geplante Mutation. Da zudem vorherige Versuche gar keine Ergebnisse geliefert hatten und Wiederholungen mit anderen Annealingtemperaturen drei weitere GCG und keine GCC Mutante hervorbrachten, wurde zunächst mit dieser Mutante weiter gearbeitet, um die R358A Mutation ebenfalls einzuführen.

Als diese Mutation nach mehreren Versuchen bei unterschiedlichen PCR-Bedingungen nicht erfolgreich eingeführt werden konnte (und da auch die parallel zur R302A Mutation durchgeführten Versuche zum Einbringen der Mutation in das wt TRPM2 nicht erfolgreich waren), wurde schließlich das Plasmid mit den beiden Mutationen 1544-1546, 1713-1715; AGG>GCC, CGC>GCC über das In vitro Mutagenese Angebot von Eurofins Genomics bezogen und per Maxipräperation vervielfältigt.

## 4.1.2 Nachweis der Expression der Mutanten in der Plasmamembran

Nachdem die Expressionsvektoren für TRPM2 wt und die Mutanten in der NUDT9H bzw. **MHR1/2** Domäne in HEK-293 Zellen transfiziert wurden, wurde eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt. Dazu wurde EZ-Link Sulfo NHS-LC-Biotin verwendet. Durch die negative Ladung der Sulfonsäuregruppe kann diese Verbindung die Zellmembran nicht passieren. Dementsprechend kann sie nur mit den Teilen von Membranproteinen reagieren, die von außerhalb der Zelle zugänglich sind. Der Ester, über den Sulfo-NHS und Biotin verbunden sind, kann von dem freien Elektronenpaar einer Aminogruppe (wie der ε-Aminogruppe von Lysin) nukleophil angegriffen werden. Dabei entstehen eine Bindung zwischen Biotin und Protein und freies Sulfo-NHS. Auf diese Art konnten die Oberflächenproteine biotinyliert werden.

Mithilfe eines kommerziellen Kits wurden die Membranproteine in ihrer nativen Konformation extrahiert und anschließend wurden Kügelchen mit Neutravidin (einer optimierten Variante des Biotin-bindenden-Proteins) verwendet, um die markierten Proteine vom so erhaltenen Extrakt abzutrennen.

Diese Proben wurden per SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Dazu wurde die Membran auf einer Höhe, die einem Proteingewicht von 140 kDa entspricht, geteilt, wofür die Markerbanden als Orientierung dienten.

Zudem ist bereits in der Ponceau-gefärbten Membran (Abbilding 4.1 A) zu erkennen, dass jeweils mehr des gesamten Membranproteins als des biotinylierten Proteins auf der Membran vorhanden ist.

In der anschließenden Detektion der Antikörper (Abbildung 4.1, B) ist zu erkennen, dass in allen Proben die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase vorhanden ist. Zudem ist in der Negativkontrolle pIRES2-EGFP, wie erwartet kein TRPM2 nachzuweisen.

In den Proben der Zellen, die mit dem Expressionsvektor für TRPM2 wt oder die beiden Mutanten transfiziert wurden, ist in allen Fällen TRPM2 grundsätzlich im Membranprotein und auch spezifisch im biotinylierten Protein enthalten. Somit konnte gezeigt werden, dass die mutierten Kanäle in der Plasmamembran integriert vorhanden sind.



(b)

MW kDa <sup>_</sup>	R302A R358A		R1404Q		TRPM2 wt		EGFP		
	В	М	В	М	В	М	В	Μ	-
260 -									
140 -		-	-	-					- TRPM2
140		_							Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -
100 -	驗	18		88					<sup>-</sup> ATPase

- B Biotinyliertes Plasmamembranprotein
- M gesamtes Membranprotein

#### Abbildung 4.1: Nachweis von TRPM2 Mutanten in der Plasmamembran

HEK-293 Zellen wurden mit pIRES2-EGFP Vektoren ohne zusätzliches Insert, mit der codierenden Sequenz für TRPM2 wt, oder für die TRPM2 Mutanten R302A/R358A in der MHR1/2 Domäne bzw. R1404Q in der NUDT9H Domäne transfiziert. Nach 24 Stunden wurde eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt und die Membranproteine (M) extrahiert. Aus einem Teil der Proben wurden mittels Neutravivdin die biotinylierten Proteine (B) gereinigt. Zu jedem Expressionsversuch wurden beide Proben auf einem 4-15 %igen SDS Gel getrennt und im Western Blot auf eine Membran übertragen. (a) Ponceau-Färbung mit eingezeichneter Linie auf Höhe von 140 kDa in der die Membran geteilt wurde. (b) Ausschnitt der Membran nach Behandlung mit  $\alpha$ -TRPM2 Antikörper bzw.  $\alpha$ -Na<sup>+</sup>/Ka<sup>+</sup>-ATPase Antikörper aus Kaninchen und anschließend einem  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase, Detektion mittels Chemolumineszenz (Abbildungsteil b modifiziert nach 110, Abbildung 3, unter CC BY Lizenz).

#### 4.1.3 Untersuchung der Aktivität der TRPM2-Mutanten

Die Mutanten der MHR1/2 bzw. NUDT9H Domäne wurden in HEK-293-Wildtyp Zellen exprimiert, um ihre Reaktion auf ADPR und 2dADPR in Patch Clamp Experimenten zu untersuchen. Das grundsätzliche Vorgehen bei diesem Experiment und repräsentative Beispiele dafür, wie die Rohdaten der Experimente dargestellt werden können, sind in Abbildung 4.2 gezeigt.





(a) Dargestellt ist jeweils der Verlauf der Stromstärke, der während einer einzelnen Spannungsrampe gemessen wurde, als Funktion der Spannung. (b) Der Verlauf der Stromstärke jeweils bei +15 mV für alle 90 Rampen einer Messung. (c) Der zeitliche Verlauf der Spannung einer einzelnen Rampe (modifiziert nach 110, Anhang 1 unter CC BY Lizenz).

Es wurde jeweils die Stromstärke im Verlauf von 90 konsekutiven Spannungsrampen gemessen. Die Stromstärken aller Rampen jeweils am Punkt von +15 mV wurden im Verlauf der 90 Rampen aufgetragen, wobei die charakteristische Kinetik zu erkennen war: Die Stromstärke steigt erst an, erreicht nach etwa 2 min ein Maximum und wurde dann wieder geringer, was auf eine schnelle Aktivierung und langsame Inaktivierung der Kanäle schließen lässt.

Die maximale Stromstärke bei +15 mV wurde als Kenngröße verwendet, sodass das Experiment auf einen Datenpunkt reduziert mit den Ergebnissen der Messungen an anderen Zellen statistisch ausgewertet werden konnte.

In Abbildung 4.3 ist dargestellt, wie HEK-293-Zellen, die TRPM2 wt, die MHR1/2 Domäne-Mutante R302A/R358A bzw. die NUDT9H-Domäne-Mutante R1404Q exprimieren auf die Agonisten ADPR, 2dADPR sowie auf eine Mischung beider Agonisten reagieren. Dabei zeigt sich für die Experimente mit TRPM2 wt und Puffer eine durchschnittliche Stromstärke von 0,09 nA ± 0,01 nA (n=20). Auf 250  $\mu$ M ADPR reagieren die Zellen mit 4,64 nA ± 1,62 nA (n=20), auf 2dADPR mit einer deutlich höheren Stromstärke von 16,2 nA ± 2,16 nA (n=20).

Dies bestätigt bereits publizierte Ergebnisse, bei dem hTRPM2 wt mit höherer Stromstärke auf 2dADPR als auf ADPR reagiert (77, 84).

Eine Mischung der beiden Agonisten zu gleichen Teilen mit jeweils 125  $\mu$ M ADPR und 125  $\mu$ M 2dADPR führt zu einem Strom von 5,35 nA ± 1,8 nA (n=9). Die Experimente mit den beiden Mutanten unter identischen Bedingungen hingegen zeigen weder mit ADPR noch mit 2dADPR oder der Mischung aus beiden eine Reaktion, die signifikant von den Ergebnissen mit ausschließlich Puffer abweicht.



Abbildung 4.3: Effekt der NUDT9H bzw. MHR1/2 Domäne-Mutationen auf TRPM2-Aktivierung TRPM2 wt bzw. die Mutationen R1404Q und R302A/R358A wurden in HEK-293 Zellen exprimiert und in 90 Spannungsrampen von -85 bis +20 mV gemessen. Dargestellt ist jeweils die maximale Stromstärke bei +15 mV, die in einem Experiment mit Puffer oder Puffer mit 250  $\mu$ M ADPR, 250  $\mu$ M 2dADPR oder jeweils 125  $\mu$ M beider Agonisten in einer Zelle gemessen wurde.

Der schwarze Balken zeigt den Mittelwert der jeweiligen logarithmisch transformierten Daten. Die logarithmisch transformierten Daten wurden mittels one-way ANOVA und anschließender t-Tests mit Bonferroni-Korrektur der Signifikanzniveaus gegen die Pufferkontrolle getestet. \*\*\*\* steht für p<0,0001, ns für nicht signifikant (Abbildung publiziert in 110, Abbildung 3, unter CC BY Lizenz).

## 4.2 Die Rolle von cADPR als TRPM2 Agonist

## 4.2.1 Untersuchung der Aktivierbarkeit von TRPM2 durch cADPR

Um der Frage nachzugehen, ob es sich bei cADPR um einen TRPM2 Agonisten handelt, wurden Ganzzellableitungen bei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt, bei denen cADPR über die Patchpipette in TRPM2 exprimierende Zellen (HEK-293 TRPM2 #24) infundiert wurde.

Zunächst wurde der Effekt von cADPR auf TRPM2 unter den im Labor etablierten Bedingungen (200 nM freie Calciumionen in der Intrazellulärlösung, gepuffert durch 10 mM EGTA, Badlösung mit 140 mM NMDG statt NaCl) bei Raumtemperatur und mit bei 37°C untersucht, wobei die Puffer für die Experimente bei 37°C so angepasst wurden, dass der pH-Wert bei der Zieltemperatur dem der Standardpuffer bei Raumtemperatur entsprach (Abbildung 4.4).



#### Abbildung 4.4: Effekt von cADPR auf TRPM2 bei Raumtemperatur und 37°C

Es wurden Ganzzellableitungen von HEK-293 TRPM2 #24 Zellen bei Raumtemperatur (blau) bzw. 37°C (rot) durchgeführt. Dargestellt ist der maximale Strom bei +15 mV bei Messungen über 90 Spannungsrampen von -85 mV bis +20 mV. In der Patchpipette waren Puffer oder Puffer mit 250  $\mu$ M ADPR bzw. 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M oder 1000  $\mu$ M cADPR enthalten. Die logarithmisch transformierten Daten wurden mittels one-way ANOVA und anschließender t-Test mit Bonferroni-Korrektur der Signifikanzniveaus gegen die Pufferkontrolle getestet. \*\*\*\* steht für p<0,0001, ns für nicht signifikant (Abbildung publiziert in 110, Abbildung 1, unter CC BY Lizenz).

Bei Raumtemperatur reagierten die Zellen mit einer durchschnittlichen Stromstärke von 0,94 nA ± 0,16 nA auf 250  $\mu$ M ADPR (n=13), während der Puffer allein eine Stromstärke von 0,06 nA ± 0,003 nA (n=13) hervorrief. Die steigenden cADPR Konzentrationen führten zu Stromstärken von 0,08 nA ± 0,01 nA (n=10) für 250  $\mu$ M cADPR, 0,10 nA ± 0,02 nA (n=11) für 500  $\mu$ M cADPR und 0,12 nA ± 0,03 nA (n=10) für 1 mM cADPR.

Bei 37°C wurde mit dem Puffer eine durchschnittliche Stromstärke von 0,22 ± 0,02 nA (n=16) gemessen, mit ADPR ergab sich 16,47 nA ± 5,48 nA (n=8). Auch hier zeigten die Messungen mit cADPR keinen signifikanten Unterschied zum Puffer, hier wurde eine durchschnittliche Stromstärke von 0,26 nA ± 0,06 (n=10) gemessen.

Die Extrazellulärlösung enthielt 140 mM NMDG<sup>+</sup> (N-Methyl-D-Glucamin), anstelle von Natriumionen. Dadurch wird rechnerisch die benötigte Osmolarität von 290 mOsm erreicht, wobei jedoch NMDG im Gegensatz zu Na<sup>+</sup> kaum durch den TRPM2 Kanal hindurchströmen kann. Diese Situation ist zwar unphysiologisch, erlaubt jedoch eine Untersuchung der TRPM2-Kanäle, ohne dass es zu einem massiven Einstrom von Natriumionen in die Zelle kommt. Um Auszuschließen, dass der fehlende Effekt von cADPR in den durchgeführten Experimenten auf das Fehlen von Natriumionen zurückzuführen ist, wurde eine Extrazellulärlösung mit 140 mM NaCl verwendet. Bei diesen Messungen konnten keine Positivkontrollen mit ADPR durchgeführt werden, da die Zellen aufgrund der hohen Stromstärke vor dem Ende der Messung zerstört wurden, jedoch konnte im Vergleich zwischen Puffer ohne Nukleotid (0,1 nA  $\pm$  0,02 nA, n=10) und Puffer mit 250  $\mu$ M cADPR (0,08 nA  $\pm$  0,01 nA, n=10) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 4.5, A).

Yu und Kollegen haben eine Aktivierung von TRPM2 durch cADPR bei geringerer Pufferung von Calciumionen durch EGTA beschrieben (93). Um zu überprüfen ob das Puffern der Calciumionen einen Einfluss auf die Aktivierbarkeit durch cADPR hat, wurde mit nominell calciumionenfreier Intrazellulärlösung gearbeitet, die statt der üblicherweise verwendeten 10 mM EGTA eine 100-fach geringere Konzentration von 100  $\mu$ M EGTA enthält. In dieser wurde untersucht, ob es einen kooperativen Effekt zwischen ADPR und cADPR gibt (Abbildung 4.5, B).

Wie von McHugh und Mitarbeiter beschrieben zeigte sich hier eine Abhängigkeit der TRPM2 Aktivierung von der intrazellulären Calciumionenkonzentration (112): In den durchgeführten Versuchen zeigte sich ein anderes Verhalten der Zellen als Reaktion auf ADPR, als es in den vorherigen Experimenten zu sehen war: Einige Zellen reagierten nur mit vergleichsweise schwachen Stromstärken von <1 nA, während bei andere deutlich größere Stromstärken von >10 nA gemessen wurden.

Dies passt zu den Beobachtungen von McHugh und Kollegen, die ebenfalls stärkere TRPM2 Aktivierung und eine sehr steile Dosis-Wirkungs-Kurve bei geringerer EGTA-Konzentration (1 mM bzw 50 µM) gemessen haben (112).

Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass es unter diesen Umständen zwei mögliche Reaktionen auf die Aktivierung eines TRPM2 Kanals gibt: Ist der Calciumioneneinstrom gering, dann schließt sich der Kanal nach kurzer Zeit wieder und es kommt nur zu einem sehr geringen Gesamtstrom. Wird jedoch eine Calciumionen Schwellenkonzentration von überschritten, wird ein positiver Feedbackmechanismus ausgelöst. Es kommt zur Aktivierung weiterer Kanäle und einem sehr viel stärkeren Strom, der in einer Alles oder Nichts Reaktion entweder entsteht, oder eben nicht. Ob er entsteht, könnte abgesehen von der initialen Calciumionenkonzentration beispielsweise auch von der Dichte der Kanäle in der Plasmamembran abhängen (112).

Zellen, bei denen mutmaßlich dieser Mechanismus nicht ausgelöst wurde, zeigten stets eine Stromstärke von weniger als 1 nA, sodass dort ein Schwellenwert für die weitere Auswertung festgelegt wurde, um die Zellen in reagierende und nicht-reagierende Zellen zu unterteilen.



# Abbildung 4.5: Effekt von cADPR auf TRPM2 in Gegenwart extrazellulärer Natriumionen und möglicher Synergismus von ADPR und cADPR bei verminderter Pufferung intrazellulärer Calciumionen

HEK-293 TRPM2 #24 Zellen wurden bei Raumtemperatur untersucht. Dargestellt ist die maximale Stromstärke bei +15 mV im Verlauf von 90 Spannungsrampen von -85 bis +20 mV. Der schwarze Balken entspricht jeweils dem Mittelwert (a) Die Zellen wurden in Badlösung mit 140 mM NaCl und Standard-Intrazellulärlösung untersucht. Die logarithmisch transformierten Daten wurden mittels beidseitigem t-Test getestet (ns steht für nichts signifikant). (b) Die Zellen wurden in Standard-Badlösung und mit nominell calciumfreier Intrazellulärlösung untersucht, die Reaktion auf ADPR wurde mit der Reaktion auf die gleiche ADPR-Konzentration in Kombination mit cADPR verglichen. Die logarithmisch transformierten Daten wurden mittels Kruskal-Wallis Test mit Dunn-Korrektur getestet (ns steht für nicht signifikant, \*\*\*\* steht für p<0,0001), die gestrichelte Linie zeigt den Grenzwert, über den reagierende und nicht reagierende Zellen unterschieden werden, die graue Zahl oberhalb der Trennlinie die Anzahl reagierender, die graue Zahl unten die Anzahl nichtreagierender Zellen (Abbildung publiziert in 110, Abbildung 2, unter CC BY Lizenz).

In den Experimenten, in denen Puffer ohne Nukleotide infundiert wurde, überschritt keine der dreizehn untersuchten Zellen den Grenzwert von 1 nA. Bei der Verwendung von 50  $\mu$ M ADPR reagierten zwei von insgesamt zwölf untersuchten Zellen, während bei einer Konzentration von 75  $\mu$ M ADPR nur eine einzige der sechzehn untersuchten Zellen keine Reaktion zeigte. Demnach befindet sich zwischen 50  $\mu$ M und 75  $\mu$ M die Schwellenkonzentration, ab der ein Großteil der Zellen mit einer hohen Stromstärke reagiert, vermutlich aufgrund des von McHugh und Kollegen beschriebenen positiven Feedbacks. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Proben, bei denen die gleiche ADPR-

Konzentration in Kombination mit 125  $\mu$ M cADPR verwendet wurde, ähneln sich die Gruppen mit und ohne cADPR jeweils deutlich: Im Vergleich zu den zwei von zwölf Zellen, die auf 50  $\mu$ M ohne ADPR reagieren, zeigt eine von dreizehn Zellen mit 50  $\mu$ M ADPR und 125  $\mu$ M cADPR eine Reaktion. Bei 75  $\mu$ M ADPR reagieren ohne cADPR fünfzehn der sechzehn untersuchten Zellen, mit cADPR sind es sechzehn von zwanzig. Auch hier liegt der Schwellenwert der ADPR-Konzentration also zwischen 50  $\mu$ M und 75  $\mu$ M.

In beiden Fällen zeigt sich dabei kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Verhalten der Zellen mit oder ohne cADPR, also kein synergistischer Effekt von ADPR und cADPR zur Aktivierung von TRPM2.

Ein weiterer, in der Literatur beschriebener TRPM2 Agonist ist IDPR, der humanes TRPM2 ab einer Konzentration von 600  $\mu$ M aktiviert und bei einer Konzentration von 1 mM deutliche Ströme hervorruft (106). Der Unterschied zwischen ADPR und IDPR besteht darin, dass die entsprechende Base im Molekül entweder Adenin oder Hypoxanthin ist. In beiden Fällen ist jedoch ein Derivat möglich, bei dem eine N-glykosidische Bindung zwischen dem ersten Stickstoff (N1) der Base und dem ersten Kohlenstoff (C1) der terminalen Ribose besteht. Es handelt sich dabei je nach Base um cADPR oder *N*1-cIDPR.

Im Gegensatz zu cADPR, dass leicht zu ADPR hydrolysiert, sodass es zu Verunreinigungen von cADPR-Proben mit ADPR kommt, bleibt *N*1-cIDPR auch nach 2 Stunden bei 95 °C stabil, sodass kein IDPR in einer HPLC-Untersuchung nachgewiesen werden konnte (110).

Aus diesem Grund wurde sowohl kommerziell verfügbares IDPR und N1-cIDPR (Biolog, Bremen) als auch IDPR, das von der Arbeitsgruppe von Prof. Barry Potter zur Verfügung gestellt wurde, auf seine Eigenschaften als TRPM2 Agonist untersucht (Abbildung 4.6, A). Mit Puffer ohne Nukleotide wurde eine Stromstärke von 0,08 nA  $\pm$  0,01 nA (n=14) gemessen. 1 mM des IDPR von Biolog rief eine Stromstärke von 0,09 nA  $\pm$  0,01 nA (n=20) hervor, für 3 mM waren es 0,10 nA  $\pm$ 0,01 nA (n=21). Es war dementsprechend kein signifikanter Unterschied der Reaktionen mit IDPR im Vergleich zum Puffer festzustellen. Auf IDPR aus dem Labor von Prof. Potter reagierten allerdings drei der einunddreißig untersuchten Zellen, woraus sich ein signifikanter Unterschied zur Pufferkontrolle ergab.

Mit N1-cIDPR hingegen wurde eine Stromstärke von 0,11 nA ± 0,02 nA (n=19) und damit ebenfalls kein signifikanter Unterschied zum Puffer festgestellt.

Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens in den Patch-clamp Experimenten wurden die beiden IDPR-Proben mittels RP-HPLC miteinander verglichen. Es wurden jeweils 5 nmol injiziert. Der Hauptpeak (Rt 5.28 min) zeigte eine vergleichbare Fläche (1414 mAU\*min Biolog-IDPR, 1622 mAU\*min IDPR aus Potter-Labor), so dass es unwahrscheinlich erscheint, dass das unterschiedliche Verhalten auf Unterschiede in der Konzentration der beiden Proben zurückzuführen ist. In der Biolog-Probe machte der IDPR-Peak 99,2 % der Gesamtfläche aus, bei dem IDPR aus dem Labor von Prof. Potter sind es 97 % (Abbildung 4.6, B), es erscheint also möglich, dass die Effekte auf Verunreinigungen der Probe zurückzuführen sind (a)

(b)





(a) HEK-293 TRPM2 #24 Zellen wurden bei Raumtemperatur in Standard-Extrazellulärlösung mit nominell calciumionenfreier Intrazellulärlösung untersucht. Dargestellt ist jeweils die maximale Stromstärke bei +15 mV, die im Verlauf von 90 Spannungsrampen von -85 bis +20 mV erreicht wurde. Die verwendeten Nukleotide sind IDPR von Biolog, IDPR aus der Gruppe von Barry Potter bzw. *N*1cIDPR von Biolog (102). Die logarithmisch transformierten Daten wurden mittels Kruskal-Wallis Test mit Dunn-Korrektur getestet (ns steht für nicht signifikant, \* steht für p<0,05, \*\*\*\* steht für p<0,0001), der schwarze Balken gibt den jeweiligen Mittelwert an.

(b) Reverse Phase HPLC Analyse von je 5 nmol der beiden IDPR Proben

## 4.2.1 Inhibition von TRPM2 durch 8-Br-ADPR und 8-Br-cADPR

Es wurde in der Literatur beschrieben, dass 8-Br-cADPR ein spezifischer Inhibitor für cADPR-induzierte Ströme durch TRPM2 ist. Die Auswirkung auf ADPR besteht jedoch nicht in einer Inhibition als Verringerung der maximalen Stromstärke, sondern es verkürzt die Zeit, bis diese erreicht wird (87). Da in Kapitel 4.2.1 gezeigt wurde, dass cADPR TRPM2 unter den getesteten Konditionen nicht aktiviert, konnte nicht untersucht werden, ob 8-Br-cADPR ein spezifischer Antagonist für cADPR ist.

Da jedoch Huang und Kollegen eine Bindung von cADPR sowie 8-Br-cADPR an die MHR1/2 Domäne des hTRPM2 beobachteten (92) wurde nun der Effekt von 8-Br-cADPR untersucht und mit dem des TRPM2 Inhibitors 8-Br-ADPR verglichen. Sowohl der Effekt der beiden Derivate jeweils allein als auch ein möglicher Antagonismus wurde getestet, indem die beiden Derivate jeweils einzeln oder in Kombination mit 125  $\mu$ M ADPR verwendet wurden.

Dabei wurde bei den Zellen, die nur mit Puffer in der Patchpipette behandelt wurden eine Stromstärke von 0,02 nA  $\pm$  0,01nA (n=10) gemessen, mit 1 mM 8-Br-ADPR ergab sich eine Stromstärke von 0,13 nA  $\pm$  0,06 nA (n=10), während 1 mM 8-Br-cADPR eine Stromstärke von 0,09 nA  $\pm$  0,03 nA (n=13) hervorrief.

Hingegen zeigte sich deutlich, dass vier von vier Zellen mit einer Stromstärke von 34,91 nA  $\pm$  6,37 nA (n=4) durch 125  $\mu$ M ADPR aktiviert wurden, während nur vier der vierzehn getesteten Zellen auf die Kombination aus ADPR und 8-Br-ADPR reagierten. Die Kombination aus ADPR und 8-Br-c-ADPR rief in fünf von neunzehn untersuchten Zellen eine Reaktion hervor. Beide Inhibitoren jeweils zusammen mit ADPR zeigten einen statistisch signifikanten Effekt gegenüber ADPR. Allerdings zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen 8-Br-ADPR und 8-Br-cADPR, die in der untersuchten Konzentration von 1 mM vergleichbar stark inhibierend auf die Aktivierung von TRPM2 durch ADPR wirken.



#### Abbildung 4.7: Effekt von 8-Br-ADPR und 8-Br-cADPR als TRPM2 Antagonisten

Ganzzellableitungen in HEK-293 TRPM2 #24 Zellen mit nominell calciumionenfreier Intrazellulärlösung wurden über 90 Spannungsrampen von -85 bis +20 mV durchgeführt. Über die Patchpipette wurde jeweils ADPR, 8-Br-cADPR, 8-Br-ADPR, eine Kombination aus ADPR und einem der beiden Inhibitoren oder die Pufferkontrolle infundiert. Die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert der gemessenen Daten, die gestrichelte Linie markiert den Grenzwert für reagierende bzw. nicht-reagierende Zellen. Die graue Zahl oberhalb der Trennlinie gibt die Anzahl reagierender Zellen an, die Zahl unterhalb die Anzahl nicht-reagierender Zellen. Die Anzahl der reagierenden bzw. nicht-reagierenden Zellen wurde mittels des Exakten Tests nach Fisher ausgewertet (ns steht für nicht signifikant, \* steht für p<0,05) (Abbildung publiziert in 110, Abbildung 2, unter CC BY Lizenz).

#### 4.3 Etablierung eines Intrabody-basierten Reportersystems

Zur Untersuchung der TRPM2 Funktion in sich bewegenden Zellen, um beispielsweise die Rolle des Kanals in der Chemotaxis (67) besser zu verstehen, soll ein fluoreszenzbasiertes Reportersystem entwickelt werden, welches es ermöglich, ohne die Limitierungen der Patch Clamp Methode selektiv den Einstrom von Calciumionen durch TRPM2 nachzuweisen. Um dies zu erreichen braucht es einen Farbstoff, der seine Fluoreszenzeigenschaften bei der Bindung von Calciumionen ändert, und der intrazellulär an TRPM2 gebunden werden kann. Dazu kann auf bereits etablierte genetisch encodierte Calciumsensoren (GECI) zurückgegriffen werden, bei denen es sich um artifizielle Proteine auf Basis von GFP und Calmodulin handelt, die Fluoreszenz zeigen, wenn Calciumionen an sie binden (98). Die codierende Sequenz eines GECI kann an die codierende Sequenz eines Zielproteins in einem Expressionsvektor kloniert werden, sodass nach der Transfektion in Zellen ein Fusionsprotein exprimiert wird, dass die gewünschten Fluoreszenzeigenschaften besitzt und gleichzeitig das Zielprotein enthält.

Es zeigte sich allerdings, dass Fusionsproteine aus TRPM2 und N- oder C-terminalem GECO1 oder GECO1.2 in anderen Membranen als der Plasmamembran vorlagen und Zellen, die mit Expressionsvektoren für diese Proteine tranformiert worden waren, auf die Stimulation durch oxidativen Stress durch Wasserstoffperoxid nicht mit einem Calciumeinstrom reagierten (persönliche Mitteilung von Frederike Kulow und Ralf Fliegert). Daher wurde stattdessen mittels des ALFA-Systems (107) ein anderer Lösungsansatz gewählt: TRPM2 wurde mit einem ALFA-tag entweder am C- bzw. N-Terminus exprimiert, an den der Intrabody-Teil eines Intrabody-GECO-Fusionsproteins binden kann. Durch die bedeutend kleinere Größe des tags im Vergleich zum GECO soll der Kanal weniger beeinflusst und korrekt exprimiert werden.

Dazu wurde der tag direkt oder über eine Verbindungssequenz (Linker) entweder Nterminal oder C-terminal an die TRPM2 Sequenz angefügt. Im gleichen, bidirektionalen Plasmid, das für dieses Konstrukt codiert, wurde auch das Intrabody-GECO-Fusionsprotein eingefügt, sodass mit einer Transfektion eines Vektors das komplette TRPM2-Reportersystem in die Zelle gelangt.

So wird das GECO über den Intrabody an den TRPM2 Kanal in der Plasmamembran gebunden. Öffnet sich nun der Kanal, und es kommt zu einem Einstrom von Calciumionen, können diese Ionen an das GECO binden, was wiederum den Fluorophor aktiviert. So kann die Öffnung des TRPM2 Kanals im Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden (Abbildung 4.8).



#### Abbildung 4.8: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Reportersystems

Der TRPM2 Kanal wird entweder N-terminal oder C-terminal mit einem ALFA-tag versehen (Links). Der Intrabody-Teil des Intrabody-GECO-Fusionsproteins bindet das ALFA-tag, sodass TRPM2 und GECO in direkte räumliche Nähe zueinander gelangen (Mitte). Strömen Calciumionen durch den geöffneten TRPM2 Kanal, binden sie am GECO und die Fluoreszenz nimmt zu (Rechts). Die entsprechenden Klonierungen wurden von Frederike Kulow durchgeführt, woraufhin die GECO1.2-Konstrukte für weitere Experimente verwendet wurden. Diese wurden zunächst in Patch Clamp Ganzzellableitungen auf ihre Funktion hin überprüft (Abbildung 4.9).

Für die ersten Versuche wurde der Vektor, der für das Reportersystem codiert, in HEK-293 Zellen transformiert und zur Kontrolle wurden weitere Zellen mit dem TRPM2 wt Expressionsvektor transformiert, um die Funktion des Reportersystems als Kanal in Patch Clamp Ganzzellableitungen mit der des wt Kanals vergleichen zu können.

Diese Kontrolle wurde optimiert: Ein weiteres, bidirektionales Plasmid wurde verwendet, das für TRPM2 wt und das GECO-Intrabodys-Fusionsprotein codiert. Dadurch unterschied sich die Kontrolle nur durch die Abwesenheit des ALFA-tags und gegebenenfalls des Linkers von dem Reportersystem, um zu überprüfen, ob allein die Anwesenheit des Fusionsproteins, auch wenn die Bindungsstelle fehlt, einen Effekt verursacht.



#### Abbildung 4.9 Funktionsfähigkeit des TRPM2 Kanals im Kontext des Reportersystems

Die zu untersuchenden Konstrukte wurden in HEK-293 Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden Ganzzellableitungen über 90 Spannungsrampen von -85 bis +20 mV durchgeführt. Dargestellt ist jeweils die maximale Stromstärke bei +15 mV. (a) Die transfizierten Zellen wurden mit Standard-Intrazellulärlösung (Puffer) ohne Nukleotide, bzw. mit 250  $\mu$ M ADPR in der Patchpipette untersucht. (b) Die transfizierten Zellen wurden mit nominell calciumfreier Intrazellulärlösung (Puffer) ohne Nukleotide, bzw. mit 125  $\mu$ M ADPR untersucht.

(a und b) Die logarithmisch transformierten Daten wurden mittels one-way-ANOVA mit Bonferroni-Korrektur getestet (ns steht für nicht signifikant, \*\* steht für p<0,01, \*\*\* steht für p<0,001,\*\*\*\* steht für p<0,0001), der schwarze Balken gibt den Mittelwert, die Fehlerbalken den Standardfehler des Mittelwert an. Bei der Verwendung von TRPM2 wt wurde in den Zellen, die nur mit Puffer in der Patchpipette behandelt wurden, ein Strom von 0,07 nA  $\pm$  0,02 nA (n=7) gemessen, während die Aktivierung mit 250 µM ADPR Stromstärken von 4,4 nA  $\pm$  3,19 nA (n=4) hervorrief. Im Vergleich dazu reagierte das Reportersystem mit C-terminalem ALFA-tag am TRPM2 auf den Puffer mit Stromstärken von 0,27 nA  $\pm$  0,12 nA (n=4) und auf 250 µM ADPR mit 0,33 nA  $\pm$  0,11 nA (n=5). Somit ergab sich für diesen Versuch ein Reportersystem zu erstellen kein signifikanter Unterschied in der Reaktion der damit transformierten Zellen auf Puffer oder den Agonisten ADPR. (Abbildung 4.9, A).

Im Vergleich von dem Konstrukt, bei dem der ALFA-tag N-terminal angefügt worden war, mit der verbesserten Kontrolle ergab sich ein anderes Bild: Die Zellen, die mit TRPM2 wt und dem Intrabody-GECO-Fusionsprotein transformiert worden waren, reagierten mit Stromstärken von 0,09 nA  $\pm$  0,02 nA (n=8) auf den Puffer und mit 12,94 nA  $\pm$  2,58 nA (n=10) auf 125  $\mu$ M ADPR. Im Reportersystem mit N-terminal an TRPM2 angefügten ALFA-tag zeigten sich als Reaktion auf den Puffer Stromstärken von 0,15 nA  $\pm$  0,01 nA (n=7), als Reaktion auf 125  $\mu$ M ADPR waren es 6,96 nA  $\pm$  1,8 nA (n=9). Dies ergab statistisch jeweils keinen signifikanten Unterschied zwischen dem TRPM2 ohne ALFA-tag und dem Reportersystem unter den gleichen Versuchsbedingungen, während sich zwischen der Behandlung mit Puffer ohne Nukleotid und der mit 125  $\mu$ M ADPR signifikante Unterschiede darstellten. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der ALFA-tag und das daran gebundene Fusionsprotein die Funktion des Kanals nicht beeinträchtigen (Abbildung 4.9, B).

Um die Untersuchung der Fluoreszenz des Reportersystems während einer Ganzzellableitung zu untersuchen, war eine Optimierung der Pufferbedingungen notwendig, da in der Standard-Intrazellulärlösung Calciumionen enthalten sind, die ausreichen, um eine GECO-Fluoreszenz innerhalb der ersten Sekunden nach dem Öffnen der Zelle zu beobachten (Abbildung 4.10).



#### Abbildung 4.10: GECO-Fluoreszenz in Zellen ohne TRPM2 Aktivierung

HEK-293 Zellen wurden mit TRPM2 mit C-terminalem ALFA tag und einem Intrabody-GECO1.2-Fusionsprotein transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in Patch Clamp Ganzzellableitungen mit Standard-Intrazellulärlösung untersucht. Für die Videoaufnahme wurde alle 0,7 Sekunden je ein Bild der Fluoreszenz (Anregung bei 488 nm, Emission bei 510 nm) aufgenommen. Dargestellt sind zwei Einzelbilder aus dem Video. Um die passenden Intrazellulärlösung zu finden, wurden nominell calciumfreie Intrazellulärlösungen mit drei unterschiedlichen EGTA-Konzentrationen zur Pufferung der dennoch vorhandenen Calciumionen verwendet: 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 200  $\mu$ M (Abbildung 4.11). Diese wurden jeweils in Patch Clamp Ganzzellableitungen untersucht und fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Dabei zeigte sich bei der Verwendung von 50  $\mu$ M EGTA eine sichtbare Fluoreszenz als Reaktion auf das Öffnen der Zelle, während mit 100  $\mu$ M und 200  $\mu$ M EGTA diese Fluoreszenz nicht mehr zu erkennen war. Diese Konzentrationen würden sich entsprechend beide für weitere Experimente eignen, es wurde daher mit der geringeren der beiden möglichen Konzentrationen, 100  $\mu$ M gearbeitet.



**EGTA Konzentration** 

#### Abbildung 4.11: Untersuchung von nominell calciumionenfreier Intrazellulärlösung

HEK-293 Zellen wurden mit dem bidirektionalen Expressionsvektor für TRPM2 mit C-terminalem ALFA tag und einem Intrabody-GECO1.2-Fusionsprotein transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in Patch Clamp Ganzzellableitungen mit nominell calciumionenfreier Intrazellulärlösung mit den jeweils angegebenen EGTA-Konzentrationen untersucht.

So konnten Videoaufnahmen von Zellen mit TRPM2 mit N-terminalem ALFA-tag und GECO1.2-Intrabody-Fusionsprotein in nominell calciumfreier Intrazellulärlösung erstellt werden. Es ist zu erkennen, dass Zellen, die mit 125  $\mu$ M ADPR in der Pipette untersucht wurden, eine deutliche Fluoreszenzreaktion zeigten, während der Puffer allein keine Reaktion hervorrief. Repräsentative Einzelbilder sind in Abbildung 4.12 dargestellt.

Er zeigt sich außerdem, dass die Fluoreszenz in der Zelle, in die ADPR infundiert wurde, zunächst zunimmt und anschließend langsamer wieder abnimmt. Im beobachteten Zeitraum wurde die anfängliche Fluoreszenz nicht wieder erreicht. (a)



(b)



#### Abbildung 4.12: Das Intrabody basierte Reportersystem

HEK-293 Zellen wurden mit dem bidirektionalen Vektor, der für TRPM2 mit N-terminalem ALFA tag und ein Intrabody-GECO1.2-Fusionsprotein codiert, transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in Patch Clamp Ganzzellableitungen mit nominell calciumfreier Intrazellulärlösung ohne Nukleotid bzw. mit 125 μM ADPR untersucht. Für die Videoaufnahme wurde alle 0,7 Sekunden je ein Bild der Fluoreszenz (Anregung bei 488 nm, Emission bei 510 nm) aufgenommen. (a) Dargestellt sind vier Einzelbilder aus dem Video. (b) Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität während der Messung. AU steht für arbitrary unit (willkürliche Einheit).

## 5 Diskussion

Der Ionenkanal TRPM2 besitzt pro Monomer zwei Bindungsstellen für Nukelotide: Eine in der N-terminalen MHR1/2 Domäne und eine in der C-terminalen NUDT9H Domäne. In dieser Arbeit werden die Rollen dieser beiden Bindungsstellen für die Aktivierung des hTRPM2 durch ADPR sowie den Superagonisten 2dADPR diskutiert, um zu zeigen, dass beide Bindungsstellen gleichermaßen notwendig für die Aktivierung des Kanals durch diese Agonisten sind.

Anschließend wird auf die in der Literatur kontrovers diskutierte Frage eingegangen, ob es sich bei cADPR um einen TRPM2 Agonisten handelt, da sich im Rahmen dieser Arbeit deutliche Hinweise darauf ergaben, dass dies nicht der Fall ist. Die Untersuchung dieser Frage führte auch zu der Untersuchung des Kanals mittels IDPR und *N*1-cIDPR, wobei sich zeigt, dass es sich bei beiden Stoffen ebenfalls offenbar nicht um TRPM2 Agonisten handelt. Zuletzt wird zudem die Etablierung eines Intrabody-basierten Reportersystems dargestellt, welches die Möglichkeit eröffnet, die Aktivierung von TRPM2 in Zukunft fluoreszenzmikroskopisch beobachten zu können.

5.1 Die Bedeutung der Nukleotidbindungsstellen für die Aktivierung von hTRPM2

## 5.1.1 Die Bindungsstelle für Nukleotide in der NUDT9H Domäne

Aufgrund der Homologie zwischen der NUDT9H Domäne zu dem Enzym NUDT9 haben Perraud und Mitarbeiter zunächst nach dem Substrat dieses Enzyms gesucht. Dabei stießen sie auf ADPR, das nicht nur von NUDT9 hydrolytisch gespalten wird, sondern auch in der Lage ist, TRPM2 zu aktivieren (53).

Überraschenderweise zeigte sich jedoch, dass das TRPM2 Ortholog aus der Seeanemone *Nematostella vectensis* sich auch dann durch ADPR öffnen lässt, wenn die NUDT9H Domäne entfernt wurde. Dementsprechend scheint diese nicht notwendig für die Öffnung des Kanals zu sein (65). Im Gegensatz dazu ist die Öffnung der TRPM2 Orthologe aus Wirbeltieren (am Beispiel des humanen Kanals und dem des Zebrafisches *Danio rerio*) nicht mehr möglich, sobald eine Punktmutation eingeführt wird, die die Bindung von ADPR an die Bindungsstelle in der NUDT9H Domäne stört (68, 69).

Zudem ist die Enzymaktivität der nvNUDT9H Domäne deutlich messbar, während sie in der hNUDT9H Domäne minimal (62) bis nicht nachweisbar (63) ist. Dies ist auf die Mutation von zwei Aminosäuren zurückzuführen: Das Motiv REF (Aminosäuren: Arginin, Glutamat und Phenylalanin), das sich im nvTRPM an den Positionen 1442-1444 befindet, korrespondiert mit dem Motiv RIL (Aminosäuren: Arginin, Isoleucin und Leucin) an den Positionen 1404-1406 (65). Im drTRPM2 findet sich an der entsprechenden Stelle ebenfalls das Motiv RIL, und wie erwartet ist auch hier keine oder nur minimale katalytische Aktivität vorhanden (66).

Es scheint daher, als habe die NUDT9H Domäne ihre katalytische Aktivität im Laufe der Evolution der Wirbeltiere verloren und ihre Funktion möglicherweise verändert (70).

Dank der elektronenmikroskopischen Strukturaufklärung ist zudem bekannt, dass ADPR in einer ausgestreckten Konformation an die Bindungsstelle in der NUDT9H Domäne

bindet (92). Eine Bindung von cADPR erscheint aufgrund der Geometrie und der im Vergleich zu ADPR geringeren, konformationellen Freiheit von cADPR eher unwahrscheinlich.

Zur Untersuchung der Relevanz der Nukleotidbindung an der NUDT9H Domäne im hTRPM2 wurde die Mutante R1404Q verwendet, die in fluorimetrischen Messungen keinen Calciumioneneinstrom und Patch Clamp Experimenten keine Aktivierbarkeit durch ADPR zeigte, während das Vorliegen des Kanals in der Plasmamembran belegt werden konnte (114).

Dabei hat sich die Beobachtung von Perraud und Kollegen bestätigt, dass diese Mutante trotz ihrer Membranlokalisation nicht mehr durch ADPR aktivierbar ist. Darüber hinaus wurde erstmalig die Rolle der intakten NUDT9H Domäne für die Aktivierbarkeit von hTRPM2 durch den Superagonisten 2dADPR untersucht: Hier zeigte sich, dass die Domäne nicht nur für die Aktivierbarkeit durch ADPR, sondern auch für die Aktivierbarkeit durch 2dADPR notwendig ist, es in dieser Hinsicht also keinen Unterschied zwischen dem Agonisten und dem Superagonisten gibt.

## 5.1.2 Die Bindungsstelle für Nukleotide in der MHR1/2 Domäne

Nachdem der Entdeckung, dass die NUDT9H Domäne aus nvTRPM2 entfernt werden kann, ohne die Aktivierbarkeit des Kanals durch ADPR zu beeinträchtigen (65) wurde eine zweite Bindungsstelle für Nukleotide im gleichen Kanal zunächst von Kühn und Mitarbeitern postuliert (65) und anschließend in der MHR1/2 Domäne von Huang und Kollegen entdeckt (58). An diese Bindungsstelle bindet ADPR in einer hufeisenförmigen Konformation, was sie zu einem guten Kandidaten für eine mögliche Bindung von cADPR macht (92).

Auch für diese Bindungsstelle ist bereits eine Mutation bekannt, die die Bindungsstelle möglicherweise unbrauchbar macht, jedoch existieren hier widersprüchliche Hinweise in der Literatur: Während Wang und Kollegen in fluorimetrischen Messungen in Fura-2 beladenen Zellen, die die Mutante exprimieren, einen Einstrom von Calciumionen nach Stimulation mit Wasserstoffperoxid beobachteten (56) konnten Huang und Mitarbeiter in Patch Clamp Experimenten keine Aktivierbarkeit durch ADPR feststellen (92).

Nachdem zunächst das Vorliegen des mutierten Kanals in der Plasmamembran überprüft wurde, konnte seine Aktivierbarkeit durch ADPR untersucht werden. Dabei zeigte sich als Reaktion auf ADPR in der Patchpipette kein signifikant vom Puffer unterschiedlicher Strom, was die Beobachtungen der Gruppe um Huang bestätigt und damit denen von Wang und Kollegen widerspricht.

Zusätzlich wurde erstmals die Rolle der Bindungsstelle in der MHR1/2 Domäne für die Aktivierung durch den Superagonisten 2dADPR untersucht. Auch hier zeigte sich, dass die Mutante nicht durch 2dADPR aktivierbar war, was wiederum eine kritische Rolle der Bindungsstelle in der MHR1/2 Domäne für die Aktivierung des Kanals durch 2dADPR nahelegt und keinen Unterschied zwischen dem Agonisten ADPR und dem Superagonisten 2dADPR offenbart.

## 5.1.3 Die relative Bedeutung der beiden Nukleotidbindungsstellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die beiden Bindungsstellen, sowohl in der NUDT9H als auch in der MHR1/2 Domäne von essenzieller Bedeutung für die Aktivierung von hTRPM2 sowohl durch ADPR als auch durch 2dADPR sind. Damit ist einerseits das Ergebnis von Huang und Kollegen (92) bestätigt, indem die Bedeutung der Bindungsstelle in der MHR1/2 Domäne für die Aktivierung des Kanals durch ADPR gezeigt wurde, ebenso wie die Ergebnisse von Perraud und Kollegen (53), die dies für die Bindungsstelle in der NUDT9H Domäne zeigten.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit auch erstmals die Bedeutung beider Bindungsstellen für die Aktivierung des Kanals durch 2dADPR gezeigt.

Dadurch kann darauf geschlossen werden, dass der superagonistische Effekt nicht auf eine Präferenz der Nukleotide für die eine oder andere Bindungsstelle zurückzuführen ist.

Wenn nun beide Bindungsstellen für eine Aktivierung des Kanals intakt sein müssen, legt das nahe, dass es auch der Bindung der Agonisten an beide Bindungsstellen bedarf, um eben jene Aktivierung des Kanals zu bewirken.

Die Erkenntnis, dass beide Bindungsstellen gleichermaßen für die Aktivierung von TRPM2 durch die beiden genannten Nukleotide notwendig sind, macht die Frage nach dem umstrittenen Agonisten cADPR umso interessanter: Da er in seiner Konformation so eingeschränkt ist, dass es unwahrscheinlich erscheint, dass er an die Bindungsstelle in der NUDT9H Domäne binden kann, würde es nahe liegen, dass sich die Aktivierung durch cADPR von der durch die anderen Liganden deutlich unterscheidet.

## 5.2 cADPR ist kein TRPM2 Agonist

Bereits seit 1989 war bekannt, dass cADPR als sekundärer Botenstoff in der Lage war, Calciumionen aus intrazellulären Speichern zu mobilisieren (85), zudem wurde 1997 gezeigt, dass es auch einen Einstrom von Calciumionen in die Zelle bewirken kann. Guse und Kollegen spekulierten, dass dieser Einstrom durch einen Kanal der TRP-Familie erfolgen könnte (115).

Kolisek und Mitarbeiter untersuchten TRPM2 als möglichen Kandidaten für einen durch cADPR aktivierbaren Calciumkanal. Sie fanden eine Aktivierung des Kanals, der unter einem tetracyclin-aktivierten Promotor in HEK293 Zellen exprimiert wurde, sowohl durch ADPR mit einer EC<sub>50</sub> (mittlere effektive Konzentration) von 12  $\mu$ M als auch durch cADPR mit einer EC<sub>50</sub> von 700  $\mu$ M (87).

Diese Konzentration ist jedoch um Größenordnungen höher als die von Guse und Kollegen gemessene, endogene Konzentration von cADPR von etwa 2  $\mu$ M, die bei der Aktivierung von Jurkat T-Zellen vorlag und für eine langanhaltend erhöhte Calciumionenkonzentration sorgte (116). Diese wiederum unterscheidet sich nur um eine Größenordnung von der von Heiner und Kollegen gemessenen, endogenen cADPR-Konzentration in neutrophilen Granulozyten von etwa 0,2  $\mu$ M (89). Abgesehen von diesem Konzentrationsunterschied rief cADPR auch schwächere Ströme hervor, die nur etwa 5 % so stark waren, wie die mit ADPR ausgelösten Ströme. Im Gegensatz zu den durch vergleichbare Konzentrationen von ADPR

ausgelösten Strömen, die ihr Maximum bereits nach wenigen Sekunden erreichten, dauerte es bei den durch cADPR ausgelösten Strömen 100 bis 200 s, bis die maximale Stromstärke erreicht war. Diese Verzögerung zeigte sich auch bei geringeren Konzentrationen von ADPR (30 µM und weniger) (87).

Um auszuschließen, dass dieser Effekt darauf zurückzuführen sein könnte, dass cADPR in der Zelle zu ADPR hydrolysiert wurde, führten Kolisek und Kollegen Einzelkanalmessungen durch. Dabei reagierte nur einer von acht untersuchten Membranpatches auf 1 mM cADPR, woraus die Autoren schlossen, dass cADPR selbst einen limitierten, aber eben vorhandenen Effekt als TRPM2 Agonist besitzt (87). Auf die Möglichkeit, dass cADPR in der Zelle zu ADPR hydrolysiert werden könnte, gingen auch Yu und Kollegen ein, indem sie die CD38 Expression in HEK293-wt Zellen untersuchten, die sich nicht von der Negativkontrolle unterschied und zudem das Enzym in HEK293-Zellen überexprimierten. Im Lysat von Zellen mit CD38 Überexpression zeigte sich nach einer halben Stunde eine deutliche Reduktion der Menge an cADPR, während die detektierte Menge an ADPR anstieg. Diese Verschiebung war im Lysat der Wildtypzellen nicht zu beobachten (93).

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse widersprechen den Ergebnissen von Kolisek und Mitarbeitern deutlich, da in Ganzzellableitungen keine Aktivierung von TRPM2 durch cADPR in Konzentration von bis zu 1 mM (also oberhalb der gemessenen  $EC_{50}$  von 700  $\mu$ M) nachgewiesen werden konnte. Somit stimmen sie mit der Beobachtung von Yu und Kollegen insofern überein, als dass unter den gewählten Versuchsbedingungen zumindest nicht ausreichend cADPR zu ADPR hydrolysiert wird, um eine ADPR-Konzentration zu erreichen, die ausreicht, um TRPM2 zu aktivieren.

In Anbetracht der Tatsache, dass die benötigte cADPR-Konzentration vielfach höher war, als sie in Zellen zuvor gezeigt werden konnten, demonstrierten Kolisek und Mitarbeiter auch einen Effekt von cADPR in niedrigerer Konzentration, in der es TRPM2 nicht allein, sondern synergistisch mit ADPR gemeinsam aktivierte: Mit der Mischung aus beiden Agonisten beobachteten sie einen geringen TRPM2 Strom, der durch 10  $\mu$ M cADPR und 30 nM bis 300 nM ADPR ausgelöst wurde (87).

Zusätzlich untersuchten sie AMP, ein Spaltprodukt, das (gemeinsam mit Ribose-5-phosphat) entsteht, wenn ADPR beispielsweise von einer Nukleotidpyrophosphatase gespalten wird. Dieses zeigte einen inhibierenden Effekt mit einer IC<sub>50</sub> (mittlere inhibitorische Konzentration) von etwa 70 µM auf durch ADPR ausgelöste TRPM2 Ströme (87).

Der synergistische Effekt ließ sich durch 500  $\mu$ M AMP inhibieren. Ein ebensolcher, synergistischer Effekt konnte auch mit 3  $\mu$ M ADPR und 100  $\mu$ M 8-Br-cADPR gezeigt werden. Dabei wurde mit verschiedenen Proben von 8-Br-cADPR gearbeitet, von denen zwei diesen Effekt nicht zeigten (87).

Wie beschrieben zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit kein TRPM2 Strom durch cADPR. Folglich war es nicht möglich, eine Konzentration unterhalb der Schwelle, die ausreicht um TRPM2 zu aktivieren, zu verwenden. Stattdessen wurde ADPR ober- und unterhalb der entsprechenden Schwellenkonzentration (75  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M) mit und ohne zusätzliches

cADPR verwendet, um TRPM2 zu aktivieren. Dabei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen mit der gleichen ADPR-Konzentration mit oder ohne cADPR festgestellt werden, sodass ein synergistischer Effekt von ADPR und cADPR nicht bestätigt werden konnte.

Des Weiteren beobachteten Kolisek und Mitarbeiter mit dem Derivat 8-Br-cADPR eine spezifische Inhibition der durch cADPR ausgelösten Aktivierung von TRPM2. Bei der Aktivierung durch ADPR zeigte sich kein inhibierender Effekt von 8-Br-cADPR, allerdings verkürzte sich die Zeit bis zur maximalen Stromstärke (87).

Da sich in dieser Arbeit jedoch cADPR nicht als TRPM2 Agonist erwies, kann 8-Br-cADPR kein spezifischer Antagonist dafür sein. Dies warf die Frage auf, ob und welchen Effekt 8-Br-cADPR stattdessen zeigt. Dabei konnte eine Inhibition durch 1 mM 8-Br-cADPR beobachtet werden, wobei die Konzentration zehnfach höher lag, als die von Kolisek und Mitarbeitern verwendete. Unter den gewählten Versuchsbedingungen war die gemessene Inhibition durch 1 mM 8-Br-cADPR war mit der durch 1 mM 8-Br-ADPR vergleichbar.

Togashi und Kollegen zeigten durch fluorimetrische Messungen der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, dass es in TRPM2 exprimierenden HEK-293 Zellen zu einer Erhöhung der cytosolischen Calciumionenkonzentration kommt, wenn die Temperatur von Raumtemperatur auf 40°C erhöht wird. Dieser Calciumioneneinstrom wurde nicht mehr beobachtet, als calciumionenfreies extrazelluläres Medium verwendet wurde sodass es sich dabei um Calciumionen aus dem extrazellulären Medium, nicht aus den intrazellulären Speichern handeln musste. In Patch Clamp Experimenten zeigten sie TRPM2 Ströme als Reaktion auf die Erwärmung der Badlösung von 1°C pro Minute, die ihr Maximum im Bereich von 35.5 bis 37°C hatten. In weiteren Experimenten wurde über die Patchpipette ADPR infundiert, und die Temperatur so lange erhöht, bis es zu einer Inaktvierung kam. Dabei kam es während der Hitzerampen zu deutlich stärkeren Strömen als vor deren Einsetzen (88).

Im Vergleich dazu konnten sie bei Raumtemperatur zwar keine Reaktion auf 100  $\mu$ M cADPR messen, diese jedoch durch die zusätzliche Erwärmung der Zellen hervorrufen. Eine TRPM2 Mutante ohne NUDT9H Domäne zeigte diesen Effekt jedoch nicht, was die Autoren veranlasste, die Hypothese zu formulieren, dass cADPR über die NUD9H Domäne auf TRPM2 wirkt. In RIN-5F, einer Ratten-Insulinom-Zelllinie mit endogener TRPM2 Expression, zeigte sich ein vergleichbarer Effekt, bei dem die Kombination von 100  $\mu$ M cADPR und Temperaturen über 34°C aber unter 42°C ebenfalls Ströme hervorrief, der durch TRPM2 siRNA unterdrückt werden konnte (88).

Um die Rolle der Temperatur bei der Aktivierung von TRPM2 durch cADPR zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Ganzzellableitungen bei 37°C durchgeführt, bei denen jeweils ADPR, cADPR oder Puffer in TRPM2 exprimierende HEK-293 Zellen infundiert wurde. Dabei wurde beobachtet, dass es sowohl zu einem leicht erhöhten Strom durch die Temperatur allein kam, da auch bei der Gabe von Puffer erhöhte Stromstärken im Vergleich zur Raumtemperatur gemessen wurden.

Dies könnte die Beobachtungen von Togashi und Kollegen bestätigen, jedoch auch durch einen TRPM2-unabhängigen Effekt wie beispielsweise die höhere Beweglichkeit der Ionen bei höherer Temperatur erklärbar sein. Eine Aktivierung von TRPM2 durch cADPR konnte jedoch auch bei 37°C nicht nachgewiesen werden.

Gegenteilige Beobachtungen zu den zuvor veröffentlichten Ergebnissen, dass es sich bei cADPR unter den entsprechenden Umständen um einen TRPM2 Agonisten handelt, wurden von Tóth und Csanády gemacht, die Oocyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* zur Expression von hTRPM2 verwendeten und dieses in Inside-Out-Patches untersuchten. In ihren Experimenten konnten sie keinen inhibierenden Effekt von 200  $\mu$ M AMP auf ADPR-induzierte TRPM2 Ströme zeigen, egal ob AMP direkt appliziert oder die TRPM2-Membran-Patches damit bereits vorinkubiert wurden, bevor ADPR zugesetzt wurde (90). Dies steht im Gegensatz zu der Untersuchung von Kolisek und Mitarbeitern, die eine Inhibierung von TRPM2 durch AMP mit einer IC<sub>50</sub> (mittlere inhibitorische Konzentration) von etwa 70  $\mu$ M beobachteten (87), deckt sich hingegen mit den Beobachtungen von Moreau und Kollegen, die in Ganzzellableitungen in TRPM2 exprimierenden Zellen ebenfalls keine Inhibition durch AMP beobachteten (91).

In Experimenten mit kommerziell erhältlichem cADPR wurde zwar zunächst eine Aktivierung der Kanäle, jedoch kein synergistischer Effekt mit ADPR beobachtet und eine massenspektrometrische Untersuchung ergab, dass die cADPR Proben mit etwa 50 % ADPR kontaminiert waren. Dies ließ darauf schließen, dass der Effekt, der bei der Gabe von cADPR beobachtet wurde, auf ADPR zurückzuführen war. Daher nutzten Tóth und Csanády Nukleotidpyrophosphatase, die ADPR in AMP und Ribose-5-phosphat spaltet. Da sie weder für AMP noch für Ribose-5-phosphat einen Effekt auf TRPM2 beobachteten, konnte nach der Filtration zur Entfernung der Nukleotidpyrophosphatase cADPR ohne ADPR verwendet werden, um den tatsächlichen Effekt von cADPR ohne ADPR-Kontamination auf TRPM2 zu untersuchen. Unter diesen Bedingungen konnte nun weder eine Aktivierung von TRPM2 durch cADPR beobachtet werden, noch ließ sich der synergistische Effekt von cADPR und ADPR bestätigen (90).

Als mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte von cADPR und AMP in Ganzzellableitungen weisen die Autoren darauf hin, dass die unterschiedlichen Adeninnukleotide in einem metabolischen Netzwerk um ADPR stehen, also Stoffwechselprodukte voneinander sind. Durch das Vorhandensein von zellulären Enzymen in den Zellen, an denen die Ganzzellableitungen durchgeführt werden, könnten die Nukleotide weiter umgewandelt werden, sodass die beobachteten Effekte anderen Stoffwechselprodukten zuzuschreiben sind. Im Fall von cADPR war die kommerziell erhältliche Substanz zudem mit ADPR verunreinigt, was die Aktivierung von TRPM2 durch das enthaltene ADPR erklären würde. Zudem ist die Aktivierung von TRPM2 abhängig von der Konzentration der Calciumionen und cADPR ist als Calciumionen mobilisierender, sekundärer Botenstoff bekannt. Der synergistische Effekt besteht daher möglicherweise nicht zwischen ADPR und cADPR, sondern zwischen ADPR und den durch cADPR hinzugekommenen Calciumionen. Dieser Effekt könnte beispielsweise vermittels des Ryanodinrezeptors auftreten (90).

Die Verunreinigung von kommerziell erhältlichem cADPR mit ADPR konnte auch innerhalb der hiesigen Arbeitsgruppe mittels HPLC bestätigt werden, wobei die Substanz von Biolog nur einen relativ kleinen Anteil dieser Verunreinigung enthielt (1 mM eingesetztes cADPR enthielt etwa 20  $\mu$ M ADPR). Für die durchgeführten Experimente wurde das relativ wenig verunreinigte ADPR verwendet, wobei die enthaltene Menge unter der gewählten Versuchsbedingungen offenbar nicht ausreichte, um TRPM2 zu aktivieren. Es zeigte sich ein leichter, wenn auch nicht signifikanter Trend zu höheren Stromstärken bei höheren cADPR und damit höheren ADPR-Konzentrationen, sodass zu vermuten steht, dass eine noch höhere eingesetzte cADPR-Konzentration mit der entsprechend erhöhten ADPR-Konzentration auch zu einer Aktivierung von TRPM2 durch das enthaltene ADPR geführt hätte.

In den durchgeführten Experimenten konnte nicht nur die Beobachtung von Tóth und Csanády bestätigt werden, dass es keinen synergistischen Effekt zwischen ADPR und cADPR gibt. Da sich dieser in Ganzzellableitungen mit reduzierter Pufferung der Calciumionen nicht zeigt, kann zudem die Hypothese verworfen werden, der Effekt bestünde statt mit cADPR mit den von cADPR mobilisierten Calciumionen.

Dies steht offenbar im Widerspruch zu den Ergebnissten von Yu und Mitarbeitern, die die Aktivierbarkeit von TRPM2 durch ADPR und selbst-synthetisiertes bzw. gereinigtes cADPR untersuchten und unter ihren Versuchsbedingungen eine  $EC_{50}$  für cADPR bei Raumtemperatur von etwa 250  $\mu$ M fanden. Zudem konnten sie eine Aktivierung der TRPM2-Kanäle mit 10  $\mu$ M cADPR bei 37°C demonstrieren (93).

Allerdings zeigt sich in der Massenspektrometrie des von dieser Gruppe verwendeten cADPR ein Peak, den die Autoren als cADPR und Wasser deklarieren, bei dem es sich aber ebenso um ADPR handeln könnte (93), sodass auch hier die Möglichkeit besteht, dass die Aktivierung des Kanals nicht auf cADPR, sondern auf die Verunreinigung mit ADPR zurückzuführen ist.

Nachdem die Struktur von TRPM2 sowohl in Gegenwart von ADPR als auch von 8-BrcADPR mittels EM gelöst wurde, wurde auch die Frage, ob cADPR als TRPM2 Agonist fungieren kann, neu aufgerollt:

Huang und Kollegen stellten die Bindung von ADPR sowohl in der MHR1/2 als auch in der NUDT9H Domäne des hTRPM2 fest, während sie 8-Br-cADPR nur in der MHR1/2 Domäne fanden. Dabei band ADPR in der NUDT9H Domäne in einer ausgestreckten Konformation, während es in der MHR1/2 Domäne hufeisenförmig vorlag – einer Konformation, die cADPR und 8-Br-cADPR ähnelt (92).

Eine Bindung von cADPR und 8-Br-cADPR an die isolierte MHR1/2 Domäne aus drTRPM2 konnte von Simon Sander in isothermaler Titrationskalorimetrie nicht bestätigt werden, während die endotherme Bindung von ADPR (k<sub>D</sub>=2,2  $\mu$ M ± 1,1  $\mu$ M, n=3) und 8-Br-ADPR (k<sub>D</sub>=1,4  $\mu$ M ± 0,5  $\mu$ M, n=3) deutlich messbar war (110). Betrachtet man jedoch die größere Ähnlichkeit von drTRPM2 und hTRPM2 zueinander und die Hypothese, dass es eine evolutionäre Veränderung der Bedeutung der Bindungsstellen gab, durch die sich die beiden Kanäle von nvTRPM2 unterscheiden (70), kann man spekulieren, dass diese Ergebnisse auf den humanen Kanal übertragbar sein könnten. Dies muss jedoch nicht zwangsläufig der Fall sein, da sich die Orthologe durchaus in einigen Aspekten unterscheiden und beispielsweise erst kürzlich gezeigt wurde, dass 2dADPR zwar für den humanen Kanal als Superagonist fungiert, jedoch nicht zu einer signifikant stärkeren Aktivierung von drTRPM2 führt (117).

Während auf der einen Seite die Nukleotidbindungsstelle in der MHR1/2 Domäne als Bindungsstelle für cADPR diskutiert wurde, brachten Yu und Mitarbeiter auch die Möglichkeit auf, dass es an die Bindungsstelle in der NUDT9H Domäne binden könnte: eine Molekül-Dynamik-Simulation mit einem Homologie-Modell der NUDT9H-Domäne und ADPR bzw. cADPR über 15 ns weist auf eine ähnliche, direkte Interaktion der beiden Moleküle mit elf Aminosäuren von TRPM2 hin, während sich die Interaktion der Liganden an den Aminosäuren H1346 (Histidin), T1347 (Threonin) und E1404 (Glutamat) unterschied (93). Die in *E. coli* exprimierte und gereinigte NUDT9H Domäne war in wässriger Lösung nicht stabil, weshalb sie in einer Lösung mit einem Detergenz verwendet wurde, um mittels Oberflächenplasmonenresonanz eine Bindung von ADPR ( $k_D = 70,2 \mu M \pm 10,0 \mu M$ ) und von cADPR ( $k_D = 11,5 \mu M \pm 5,8 \mu M$ ) an die NUDT9H Domäne zu zeigen (93). Dass hier eine verhältnismäßig schwache Bindung von ADPR und eine stärkere Bindung von cADPR gemessen wurde, ist eine interessante Beobachtung, inwieweit diese in Gegenwart von Detergenz gemachte Messung allerdings auf physiologische Umstände übertragbar ist, lässt sich nicht mit Gewissheit sagen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass cADPR unter den gewählten Versuchsbedingungen (bei 37°C mit NMDG<sup>+</sup> in der Badlösung und intrazellulärer Pufferung der Calciumionen durch 10 mM EGTA, bei Raumtemperatur sowohl mit NMDG<sup>+</sup> oder Na<sup>+</sup> in der Badlösung und bei intrazellulärer Pufferung der Calciumionen mit 10 mM oder 100  $\mu$ M EGTA) nicht in der Lage ist TRPM2 zu aktivieren. Dies stützt die Annahme, dass sich bei den ersten Beobachtungen der Gruppen um Kolisek (87) und Togashi (88) tatsächlich nur um Artefakte aus der Verunreinigung von cADPR mit ADPR handelt, wie Heiner und Kollegen, Tóth und Csanády beschrieben haben (89, 90). Diese Verunreinigung könnte auch bei Yu und Kollegen vorliegen, wenn man die Daten ihrer massenspektrometrischen Analyse betrachtet. Dort zeigt sich ein Peak, den die Autoren als cADPR und Wasser deklarieren, bei dem es sich aber ebenso um ADPR handeln könnte (92).

Zudem können 8-substituierte cADPR-Derivate wie 8-Br-cADPR von zellulären Enzymen zu ihren entsprechenden ADPR-Derivaten hydrolysiert werden (118, 119). Dies würde zum einen erklären, warum sich eine Inhibition von TRPM2 mit beiden Substanzen zeigt, während in der isothermalen Titrationskalorimetrie zwar eine Bindung von 8-Br-ADPR aber nicht von 8-Br-cADPR an die drMHR1/2 Domäne messbar ist. Zum anderen wäre es außerdem möglich, dass es sich bei der Substanz, die in der EM-Struktur als 8-Br-cADPR identifiziert wurde (91), eigentlich um 8-Br-ADPR handelt, welches ebenfalls in einer Hufeisenform an die Nukleotid-bindungsstelle in der MHR1/2 Domäne bindet, wie es ADPR tut, da die Auflösung der Struktur nicht so hoch ist, das der Unterschied zwischen beiden zweifelsfrei erkennbar wäre.

### 5.3 Die Rolle von IDPR und cIDPR

Nachdem Lin und Kollegen gezeigt haben, dass IDPR ein Substrat von NUDT9 ist (120), haben Kühn und Mitarbeiter gezeigt, dass es auch als Ligand für nvTRPM2 und hTRPM2 fungiert. Dabei zeigte sich, dass eine nvTRPM2 Mutante ohne die NUDT9H-Domäne nicht durch IDPR aktiviert wurde (113), obwohl die Aktivierung dieser Mutante durch ADPR bereits bekannt war (65). Dies spricht dafür, dass die Aktivierung von nvTRPM2 durch ADPR über die MHR1/2 Domäne vermittelt wird, während für die Aktivierung durch IDPR (auch) die NUDT9H-Domäne notwendig ist.

Daher erschien es sinnvoll, IDPR und *N*1-cIDPR zu verwenden, um die Beobachtungen zur Wirkung von cADPR weiter zu untermauern, da es sich bei *N*1-cIDPR um ein Analogon zu cADPR handelt, welches innerhalb der Zelle nicht zu IDPR hydrolysiert wird (121).

Allerdings konnte die Wirkung von IDPR auf TRPM2 in Ganzzellableitungen mit kommerziell erhältlichem IDPR nicht bestätigt werden, während das IDPR, welches von Prof. Potter zur Verfügung gestellt und auch in der Veröffentlichung von Kühn und Mitarbeitern verwendet wurde, in einem Teil der Zellen einen Strom hervorrief. Dabei wurde 1 mM IDPR verwendet.

Kühn und Kollegen beschreiben, dass hTRPM2 nur in einigen Zellen von 600  $\mu$ M IDPR aktiviert werden konnte, während 1 mM eine robuste Antwort hervorrief (113). Da im Rahmen dieser Arbeit nur einige Zellen auf die Infusion von 1 mM IDPR (Potter) reagierten, aber in diesen Zellen durchaus deutliche Reaktionen messbar waren, wäre es möglich, dass unter den verwendeten Versuchsbedingungen eine noch höhere IDPR-Konzentration nötig gewesen wäre, um eine robuste Reaktion der Zellen zu erhalten.

In der Untersuchung der beiden Proben unterschiedlicher Herkunft mittels HPLC zeigte sich, dass in der IDPR-Probe aus dem Labor von Prof. Potter eine zweite Substanz zu detektieren war (Retentionszeit 4,86 min). Der Anteil dieses Peaks an der Gesamtfläche machte knapp 3 % aus. Da die Identität und der Absorptionskoeffizient dieser Kontamination nicht bekannt sind, kann nicht direkt auf die Menge geschlossen werden. Wenn es sich dabei jedoch um einen TRPM2 Agonisten handelt, könnte dies ein Anhaltspunkt für sein, wie es zu der unterschiedlichen Reaktion der Zellen auf die beiden IDPR-Präparationen kommt.

## 5.4 Das TRPM2 Reportersystem

Um den Calciumioneneinstrom durch TRPM2 in mobilen Zellen zu messen, ist die Patch Clamp Methode ungeeignet, da die Zelle sich dafür fest an der Glaspipette mit der intrazellulären Elektrode befinden muss und insbesondere die Ganzzellableitung ermöglicht keine räumliche Auflösung, um polare Zellen wie Epithel- oder Endothelzellen oder migrierende Zellen sinnvoll zu untersuchen, während die Untersuchung einzelner Membranflecken von verschiedenen Stellen der Zelle ausgesprochen aufwendig ist. Ebenso ist die Messung mithilfe von in die Zelle aufgenommenen Fluoreszenzfarbstoffen nicht optimal, da hier nur die Calciumionenkonzentration im Zellplasma gemessen werden kann, ohne einen Indikator durch welchen Kanal das Calcium eintritt, oder ob es nicht stattdessen aus den intrazellulären Speichern stammt. Daher wäre es nützlich, ein System zu haben, das den Calciumioneneinstrom über den Ionenkanal direkt optisch darstellen kann.

Dies ist bereits für den speicherabhängigen Calciumionenkanal Orai1 gelungen, indem ein Fusionsprotein aus G-GECO1 und Orai1 hergestellt wurde (101). Die Verwendung eines solchen Fusionsproteins mit TRPM2 war leider nicht möglich, da dies in anderen Membranen als der Plamamembran zu finden war, und Zellen, die dieses Konstrukt exprimierten im Gegensatz zu Zellen mit TRPM2 wt auf oxidativen Stress durch Wasserstoffperoxid nicht mit einem fluorimetrisch detektierbaren Calciumioneneinstrom reagierten (persönliche Mitteilung von Frederike Kulow und Ralf Fliegert). Deshalb wurde stattdessen ein alternativer Ansatz gewählt:

TRPM2 wurde von Frederike Kulow mit einem ALFA-tag versehen, der in unterschiedlichen Konstrukten C-terminal oder N-terminal direkt an die hTRPM2 Sequenz kloniert oder über ein Verbindungspeptid mit dieser zusammengefügt wurde. Im gleichen Plasmid, das für das markierte TRPM2 kodiert, befindet sich zudem eine Sequenz für ein Fusionsprotein. Dieses besteht aus einem Intrabody, der den ALFA-tag bindet und einem G-GECO-Protein. Dabei wurden das Protein GECO1.2 mit einer k<sub>D</sub> von 1,15  $\mu$ M für Calciumionen (122) verwendet.

Es zeigte sich bei dem Konstrukt mit C-terminal angefügtem ALFA-tag kein signifikanter Strom als Reaktion auf ADPR, während die Kanäle mit N-terminalem ALFA-tag Stromstärken zeigten, die sich nicht signifikant von denen des Wildtypkanals unterschieden. Somit ist erstmals der Nachweis gelungen, dass es möglich ist, ein Epitop N-terminal an hTRPM2 anzuhängen, ohne dass die Funktion des Kanals beeinträchtigt wird.

Zum Nachweis, dass das Konstrukt als Reportersystem funktioniert, waren fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen notwendig. Unter Zuhilfenahme von Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie wurden zunächst die Pufferbedingungen hinsichtlich der Calciumionen-Pufferung durch EGTA optimiert. In Ganzzellableitungen mit einem intrazellulären Puffer mit 100  $\mu$ M EGTA ohne Nukleotid wurde keine Fluoreszenz beobachtet. Die Aktivierung der Kanäle mit ADPR im gleichen Puffer rief sowohl einen signifikanten Strom als auch eine deutlich sichtbare Fluoreszenz hervor. Das Intrabody-GECO-Konstrukt mit N-terminalem ALFA-tag am hTRPM2 ist somit als Reportersystem einsetzbar.

## 5.6 Ausblick

## 5.6.1 Zur Öffnung von TRPM2 werden beide Nukleotidbindungsstellen benötigt

In Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Bindungsstelle für Nukleotide in der MHR1/2 Domäne als auch in der NUDT9H Domäne für das Öffnen von hTRPM2 mittels ADPR und 2dADPR gleichermaßen notwendig sind. Dies unterscheidet den humanen Kanal deutlich von nvTRPM2. Auf diese Art konnte gezeigt werden, dass der superagonistische Effekt von 2dADPR nicht auf einer unterschiedlichen Präferenz der Bindungsstellen zu den Nukleotiden beruht.

## 5.6.2 cADPR ist kein TRPM2 Agonist

Die Frage, ob es sich bei cADPR um einen TRPM2 Agonisten handelt, wird bereits seit 17 Jahren kontrovers diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnten deutliche Hinweise darauf erbracht werden, dass dies nicht der Fall ist, indem gezeigt wurde, dass cADPR unter verschiedenen Versuchsbedingungen nicht in der Lage ist TRPM2-Ströme hervorzurufen. Auch ein synergistischer Effekt mit ADPR (oder möglicherweise dem von cADPR mobilisierten Ca<sup>2+</sup>) konnte in Ganzzellableitungen beobachtet werden.

Zudem konnte demonstriert werden, dass 8-Br-cADPR nicht, wie bisher in der Literatur beschrieben ausschließlich TRPM2 Ströme inhibiert, die durch cADPR hervorgerufen werden. Stattdessen konnten auch durch ADPR hervorgerufene Ströme durch die Verwendung von 1 mM 8Br-cADPR inhibiert werden.

## 5.6.3 Das Intrabody-basierte Reportersystems

Es wurde ein Reportersystem etabliert, welches die fluoreszenzbasierte Untersuchung des Calciumioneneinstroms durch TRPM2 in mobilen Zellen ohne die Beladung mit niedermolekularen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht und dabei erstmalig gezeigt, dass es möglich ist, ein Epitop N-terminal an den Kanal anzuhängen, ohne seine Funktion zu beeinträchtigen.

Dadurch wird in Zukunft eine räumlich aufgelöste Beobachtung der TRPM2 Aktivität in mobilen oder polaren Zellen ermöglicht.

# 6 Literaturliste

- 1. Berridge MJ, Lipp P, Bootmann MD (2000) *The versatility and universatility of calcium signalling* Nat Rev Mol Cell Biol 1:11-21
- 2. Kasai M, Kawasaki T, Yamaguchi N (1999) *Regulation of the ryanodine receptor calcium release channel: a molecular complex system* Biophys Chem 82(2-3): 173-81
- 3. Dolphin AC, Lee A (2020) *Presynaptic calcium channels: specialized control of synaptic neurotransmitter release* Nat Rev Neurosci 21(4): 213-29
- Trebak M, Kinet JP (2019) Calcium signalling in T cells Nat Rev Immunol 19(3): 154-69
- 5. Coste B, Mathur J, Schmidt M, Early TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A (2010) *Piezo 1 and Piezo 2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels* Science 330(6000): 55-60
- 6. Ernst OP, Lodowski DT, Elstner M, Hegeman P, Brown LS, Kandori H (2014) *Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms* Chem Rev 114(1): 126-63
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat activated ion channel in the pain pathway Nature 389:816-24
- 8. Raghavan M, Fee D, Barkhaus PE (2019) *Generation and propagation of the action potential* Hanb Clin Neurol 160: 3-22
- 9. Kirk C, Creba J, Dowes C, Michell R (1981) *Hormone-stimulated metabolism of inositol lipids and its relationship to hepatic receptor function* Biochem Soc Trans 9(5): 377-79
- Streb H, Irvine R, Berridge M, Schulz I (1983) Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate Nature 306: 67-69
- 11. Kishimoto A, Takai Y, Mori T, Kikkawa U, Nishizuka Y (1980) *Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover* J Biol Chem 225(6): 2273-76
- 12. Imagawa T, Smith JS, Coronado R, Campbell KP (1987) *Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the* Ca<sup>2+</sup>-*permeable pore of the calcium release channel* J Biol Chem 262(34): 16636-43
- 13. Meissner G, Darling E, Eveleth J *Kinetics of rapid Ca2+ release by sarcoplasmic reticulum*. *Effects of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and adenine nucleotides* Biochemistry 25(1): 236-44
- 14. McPherson PS, Kim YK, Valdivia H, Knudson CM, Takekura H, Franzini-Armstrong C, Coronado R, Campbell KP (1991) *The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel* Neuron 7(1): 17-25
- 15. MacLeannan D, Brandl C, Korczak B, Green N (1985) *Amino-acid sequence of a Ca*<sup>2+</sup> + *Mg*<sup>2+</sup>-*dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence* Nature 316: 696-700
- 16. Periasamy M, Kalyanasundaram A (2007) *SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease* Muscle Nerve 35(4): 430-42
- 17. Schatzmann HJ (1966) *ATP-dependent Ca++-extrusion from human red cells* Experientia 22(6): 364-65
- 18. Berridge MJ, Bootmann MD, Llewelyn Roderick H (2003) *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling* Nat Rev Mol Cell Biol 4(7): 517-29
- 19. Bridge HJ, Smolley JR, Spitzer KW (1990) *The relationship between charge movements associated with ICa and INa-Ca in cardiac myocytes* Science 248: 376-378
- 20. Brini M, Carafoli E (2011) *The Plasma Membrane Ca*<sup>2+</sup> *ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium* Cold Spring Harb Perspect Biol 3(2): a004168
- 21. Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak AJ, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G, Stauderman KA (2005) *STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca2+ channel function* J Cell Biol 169(3): 435-45
- 22. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A (2006) *A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function* Nature 441(7090): 179-85
- 23. Hogan PG, Rao A (2015) *Store-operated calcium entry: mechanisms and modulation Biochem* Biophys Res Commun 460(1): 40-49
- 24. Watkins JC (1962) *The synthesis of some acidic amino acids possessing neuropharmacological activity* J Med Pharma Chem 91: 1187-99
- 25. Zarei MM, Dani JA (1994) *Ionic permeability characteristics of the N-Methyl-D-aspatate receptor channel* J Gen Physio 103(2): 231-248
- 26. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005) *TRP Channels: An Overview* Cell Calcium 38(3-4): 233-52
- 27. Cosens DJ, Manning A (1969) *Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant* Nature 224(5216): 285-87
- 28. Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction Neuron 2(4): 1313-23
- 29. Clapham DE, Montell C, Schultz G, Julius D, International Union of Pharmacology (2003) *International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels* Pharmacol Rev 55(4): 591-96
- Wang Y (Editor), Li H (2017) Transient Receptor Potential Canonical Channels and Brain diseases: TRP Channel Classification Advances in Experimental Medicine and Biology 976: 1-8
- 31. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Wook Hwang S, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003) *ANKTM1*, *a TRP like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures* Cell 112(6):819-20
- 32. Montell C (2005) *Drosophila TRP Channels* Pflugers Arch: Eur J Physiol 415: 19-28
- 33. Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L (1999) *Mouse trpc2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTRPC2, a store depletion-activated capacitative Ca2+ entry channel* Proc Natl Acad Sci USA 96(5): 2060-64
- 34. Goel M, Sinkis WG, Schilling WP (2002) *Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes* J Biol Chem 277(50): 48303-10

- 35. Bai CX, Giamarchi A, Rodat-Despoix L, Padilla F, Downs T, Tsiokas L, Delmas P (2008) *Formation of a new receptor-operated channel by heteromeric assembly of TRPP2 and TRPC1 subunits* EMBO Rep 9(5): 472-479
- 36. Du J, Ma X, Shen B, Huang Y, Birnbaumer L, Yao X (2014) *TRPV2*, *TRPC1 and TRPP2 assemble to form a flow-sensitive heteromeric channel* FASEB J 28(11): 4677-85
- 37. Stübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE (2001) *TRPC1 and TRPC5 form a novel calcium channel in mammalian brain* Neuron 29(3): 645-55
- 38. Stübung C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE (2003) *Formation of novel TRPC channel by complex subunit interaction in embryonic brain* J Biol Chem 278(40): 39014-19
- 39. Veliceasa D, Ivanovic M, Thilo-Schulze Hoepfner F, Thumbikat P, Volpert OV, Smith ND (2007) *Transient receptor potential channel 4 controls thrombospondin-1 secretion and angiogenesis in renal cell carcinoma* FEBS J 274(24): 6365-77
- 40. Duncan LM, Deeds J, Cronin FE, Donovan M, Sober AJ, Kauffman M, McCathy JJ (2001) *Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma* J Clin Oncol 19(2): 568-76
- 41. Vennekes R, Olausson J, Meissner M, Bloch W, Mathar I, Philipp SE, Schmitz F, Weissgerber P, Nilius B, Flockerzi V, Freichel M (2007) *Increased IgG-dependent mast cell activation and anaphylactic response in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRM4* Nat Immunol 8(3): 312-20
- 42. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002) *A TRP channel that senses cold stimuli and menthol* Cell 108(5): 705-15
- 43. LaPlante JM, Falardeau J, Sun M, Kanazirska M, Brown EM, Slaugenhaupt SA, Vassilev PM (2002) *Identification and characterization of the single channel function of human mucolipin-1 implicated in mucolipidosis type IV, a disorder affecting the lysosomal pathway* FEBS Lett 532(1-2): 183-87
- 44. Cuajungco MP, Silva J, Habibi A, Valadez JA (2016) *The Mucolipin-2 (TRPML2) Ion Channel: a tissue-specific protein crucial to normal cell function* Pflugers Arch: Eur J Physiol 468: 177-92
- 45. Kim HJ, Li Q, Tjon-Kon-Sang S, So I, Kiselyov K, Muallem S (2007) *Gain-of-function mutation in TRPML2 causes the mouse Varitint-Waddler phenotype* J Biol Chem 282(50): 36138-42
- 46. The Nobel prize: The Nobel prize in physiology or medicine (https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/) abgerufen am 17.03.2022
- 47. Leunissen EHP, Blanchard MG, Sheedfar F, Lavrijsen M, von der Wijst J, Bindels RJM, Hoenderop JGJ (2016) Urinary β-galactosidase stimulates Ca<sup>2+</sup> transport by stabilizing TRPV5 at the plasma membrane Glycobiology 26(5): 472-81
- Palmer CP, Zhou XL, Lin J, Loukin SH, Kung C, Saimi Y (2001) A TRP homolog in Saccharomyces cerevisiae forms an intracellular Ca<sup>2+</sup>-permeable channel in yeast vacuolar membrane Proc Natl Acad Sci USA 98(14): 7801-05
- 49. Moiseenkova-Bell V, Wensel TG (2011) *Functional and structural studies of TRP channels heterologously expressed in budding yeast* Adv Exp Med Biol 704: 25-40
- 50. Venkatachalam K, Montell C (2007) TRP Channels Annu Rev Biochem 76: 387-417

- 51. Rohne P, Prochnow H, Koch-Brandt C (2016) *The CLU-files: disentaglement of a mystery* Biomol Concepts 7(1): 1-15
- 52. Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N (1998) Molecular cloning of a novel putative Ca2+ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain Genomics 54(1): 124-31
- Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM (2001) *ADP-ribose gating of calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology* Nature 411: 595-599
- 54. McQuillin A, Bass NJ, Kalsi G, Lawrence J, Puri V, Choudhury K, Detera-Wadleigh SD, Curtis D, Gurling, HMD (2005) *Fine mapping of susceptibility locus for bipolar and genetically related unipolar affective disorders, to a region containing the C210RF29 and TRPM2 genes on chromosome 21q22.3* Molecular Psychiatry 11: 134-42
- 55. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjörstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Kundberg E, Navani S, Al-Khalili Szigyarto C, Odeberg J, Djureinovic D, Ottosson Takanen J, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Pontén F (2015) *Proteomics. Tissue-based map of the human proteome* Science 347: 1260419

Human Protein Atlas (https://www.proteinatlas.org/ENSG00000142185-TRPM2/tissue) – abgerufen am 17.03.2022

- 56. Wang L, Fu TM, Zhou Y, Xia S, Greka A, Wu H (2018) *Structures and gating mechanism of TRPM2* Science 362(6421): eaav4809
- 57. Zhang Z, Tóth B, Szollosi A, Chen J, Csanády L (2018) *Structure of a TRPM2 channel in complex with calcium explains unique gating regulation* Elife 7:e36409
- 58. Huang Y, Winkler PA, Sun W, Lü W, Du J (2018) *Architecture of the TRPM2 channel and its activation mechanism by ADP-ribose and calcium* Nature 562: 145-49
- 59. Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour Dganit, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M (2002) *Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family* Nat Genet 31(2): 166-70
- 60. Runnels LW, Yue L, Clapham DE (2001) *TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities* Science 291(5506): 1043-47
- 61. Mentell C (2003) *Mg*<sup>2+</sup> *homeostasis: The Mg*<sup>2+</sup>*nificant TRPM* Chanzymes Curr Biol 13(20): R799-801
- 62. Shen BW, Perraud A, Scharenberg A, Stoddard BL (2003) *Crystal structure and mutational analysis of human NUDT9* J Mol Biol 332(2): 385-98
- 63. Gattkowski E (2021) *Biophysical characterization of the pyrophosphatase NUDT9 and the NUDT9-homologous domain of the TRPM2 channel* Dissertation, Universität Hamburg
- 64. Tóth B, Iordanov I, Csanády L (2014) *Putative enzyme activity of TRPM2 cation channel in unrelated to pore gating* Proc Natl Acad Sci USA 111(47): 16949-54

- 65. Kühn FJ, Kühn C, Winking M, Hoffmann DC, Lückhoff A (2016) ADP-Ribose Activates the TRPM2 Channel from the Sea Anemone Nematostella vectensis Independently of the NUDT9H domain PloS One 11(6):e0158060
- 66. Sander S (2022) *Characterizing Ligand-Binding Domains of TRPM2 and the P2X7 Ballast domain* Dissertation, Universität Hamburg
- 67. Kühn FJ, Lückhoff A (2004) *Sites of NUDT9H domain critical for ADP-ribose activation of the cation channel TRPM2* J Biol Chem 279(45):46431-37
- 68. Kühn FJP, Ehrlich W, Barth D, Kühn C, Lückhoff A (2019) Functional importance of NUDT9H domain and N-terminal ADPR-binding pocket in two species variants of vertebrate TRPM2 channels SciRep ):19224
- 69. Yu P, Xue X, Zhang J, Hu X, Wu Y, Jiang YW, Jin H, Luo J, Zhang L, Liu Z, Yang W (2017) *Identification of the ADPR binding pocket in the NUDT9 homology domain of TRPM2* J Gen Phys 149(2): 219-35
- 70. Fliegert R, Hölzer HT, Guse AH (2018) *TRPM2 activation: Paradigm shifted?* Cell Calcium 76: 132-34
- 71. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizo N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y (2002) *LTRPC2 Ca2+-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death* Mol Cell 9(1): 163-73
- 72. Heiner I, Radukina N, Eisfeld J, Kühn F, Lückhoff A (2005) *Regulation of TRPM2 channels in neutrophil granulocytes by ADP-ribose: a promising pharmacological target* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 371(4): 325-33
- 73. Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, Negoro T, Hiroi T, Kiuchi Y, Okada T, Kaneko S, Lange I, Fleig A, Penner R, Nishi M, Takeshima H, Mori Y (2008) *TRPM2-mediated Ca*<sup>2+</sup> *influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration* Nat Med 7: 738-47
- 74. Song K, Wang H, Kamm GB, Pohle J, de Castro Reis F, Heppenstall P, Wende H, Siemens J (2016) *The TRPM2 channel is the hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia* Science 353: 1393-98
- 75. Yang W, Zou J, Xia R, Vaal ML, Seymour VA, Luo J, Beech DJ, Jiang LH (2010) *Statedependend inhibition of TRPM2 channel by acidic* pH J Biol Chem 285(40):30411-18
- 76. McHugh D, Flemming R, Xu SZ, Perraud AL, Beech DJ (2003) *Critical intracellular Ca*<sup>2+</sup> *dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation* J Biol Chem 278(13): 11002-06
- 77. Gattkowski E, Johnsen A, Bauche A, Möckl F, Kulow F, Garcia Alai M, Rutherford TJ, Fliegert R, Tidow H (2019) *Novel CaM-binding motif in its NudT9H domain contributes to temperature sensitivity of TRPM2* Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1866(7): 1162-70
- 78. Schulman H (1997) Nitirc oxide: a spatial second messenger Mol Psychiatry 2(4): 296-99
- 79. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1983) *Molecular Biology* of the Cell Garland Science Taylor & Francis Group, 4. Auflage (2002), 617-42 und 843
- 80. Gasser A, Guse AH (2005) *Determination of intracellular concentration of the TRPM2 agonist ADP-Ribose by reversed phase HPLC J* Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 821(2): 181-87

- 81. Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, Lund FE, Santos-Argumendo L, Parkhouse RM, Walseth TF, Lee CH (1993) *Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38* Science 262: 1956-59
- 82. Takasawa S, Tohgo A, Noguchi N, Koguma T, Nata K, Sugimoto T, Yonekura H, Okamoto H (1993): Synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose by human leukocyte antigen CD38 and inhibition of the hydrolysis by ATP J Biol Chem 268(35): 26052-54
- 83. Buelow B, Uzunparmak B, Paddock M, Scharenberg A (2009) *Structure/function analysis of PARP-1 oxidative and nitrosative stress-induced monomeric ADPR formation* PLos One 4(7): e6339
- 84. Fliegert R, Bauche A, Wolf-Pérez AM, Watt JM, Rozewitz MD, Winzer R, Janus M, Gu F, Rosche A, Harneit A, Flato M, Moreau C, Kirchberger T, Wolters V, Potter BVL, Guse AH (2017) 2'-Deoxyadenosine 5'-diphosphoribose is an endogenous TRPM2 superagonist Nat Chem Biol 13(9): 1036-44
- 85. Lee HC, Walseth TF, Bratt GT, Haynes RN, Clapper DL (1989) *Structural determination of a cyclic metabolite of NAD+ with intracellular Ca*<sup>2+</sup>*-mobilizing activity* J Biol Chem 264(3): 1608-15
- 86. Sitsapesan R, McGarry SJ, Williams A (1995) *Cyclic ADP-ribose, the ryanodine receptor and Ca*<sup>2+</sup> *release* Trends Pharmacol Sci 16(11): 386-91
- 87. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R (2005) *Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRM2 channels* Mol Cell 18(1): 61-69
- 88. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M (2006) *TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion* EMBO J 25(9): 1804-15
- 89. Heiner I, Eisfeld J, Warnstedt M, Radukina N, Jüngling E, Lückhoff A (2006) Endogenous ADP-ribose enables calcium-regulated cation currents through TRPM2 channels in neutrophil granulocytes Biochem J 398(2): 225-32
- 90. Tóth B, Csanády L (2010) Identification of direct and indirect effectors of the transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel J Biol Chem 285(39): 10091-102
- 91. Moreau C, Kirchberger T, Swarbrick JM, Bartlett SJ, Fliegert R, Yorgan Y, Bauche A, Harneit A, Guse AH, Potter B (2013) *Structure-activity relationship of adenosine 5'diphosphoribose at the transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channel: rational design of antagonists* J Med Chem 56(24): 10079-102
- 92. Huang Y, Roth B, Lü W, Du J (2019) *Ligand recognition and gating mechanism through three ligand-binding sites of human TRPM2 channel* Elife 8:e50175
- 93. Yu P, Liu Z, Yu X, Peiwu Y, Liu H, Xue X, Yang L, Li Z, Wu Y, Fang C, Zhao YJ, Yang F, Hong L, Jiang LH, Zhang L, Zhang L, Yang Wei (2019) *Direct gating of the TRPM Channel by cADPR via Specific Interactions with the ADPR Binding Pocket* Cell Rep 27(12):3684-95
- 94. Galvani L, Volta A (1793) Account of Some Discoveries Made by Mr. Galvani, of Bologna; with Experiments and Observations on Them. In Two Letters from Mr. Alexander Volta, F.R.S. Professor of Natural Philosophy in the University of Pavia, to Mr. Tiberius Cavallo, F.R.S. Med Facts Obs 6: 162-210
- 95. Neher E, Sakmann B (1976) *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres* Nature 260: 799-802

- 96. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigwoth FJ (1981) *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches* Pflugers Arch: Eur J Physiol 391(2): 85-100
- 97. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) *A new generation of Ca*<sup>2+</sup> *indicators with greatly improved fluorescence properties* J Biol Chem 260(6): 3440-50
- 98. Romoser VA, Hinkle PM, Persechini A (1997) Detection in living cells of Ca<sup>2+</sup>-dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence. A new class of fluorescent indicators J Biol Chem 272(20); 13270-74
- 99. Miyawaki A, Llopis L, Heim R, McCaffrey JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) *Fluorescent indicators for Ca*<sup>2+</sup> *based on green fluorescent proteins and calmodulin* Nature 388: 882-7
- 100. Zhao Y, Araki S, Wu J, Teramoto T, Chang YF, Nakano M, Abdelfattah AS, Fujiwara M, Ishihara T, Nagai T, Campbell RE (2011) An expanded palette of genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators Science 333: 1888-91
- 101. Suzuki J, Kanemaru K, Ishii K, Ohkura M, Okubo Y, Iino M (2014) *Imaging intraorganellar Ca*<sup>2+</sup> *at subcellular resolution using CEPIA* Nat Commun 5: 4153
- 102. Dynes JL, Amcheslavsky A, Cahalan MD (2016) *Genetically targeted single-channel* optical recording reveals multiple Orai1 gating states and oscillations in calcium influx Proc Natl Acad Sci USA 113(4): 440-45
- 103. von Behring E, Kitasato S (1890) Über das Zustandekommen der Diphterie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren Deutsche Medizinische Wochenschrift 49: 1113-14
- 104. Kaufmann SHE (2019) Immunology's Coming of Age Front Immunol 10: 684
- 105. Porter RR (1959) The hydrolysis of a rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain Biochem J 73(1): 119-26
- 106. Silverston EW, Navia MA, Davies DR (1977) *Three-dimentional structure of an intact human immunglobulin* Proc Natl Acad Sci USA 74(11): 5140-44
- 107. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songs EB, Bedahman N, Hamers R (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains Nature 363: 446-48
- 108. Götzke H, Kilisch M, Martínez-Carranza M, Sograte-Idrissi S, Rajavel A, Schlichthaerle T, Engels N, Jungmann R, Stenmark P, Opazo F, Frey S (2019) *The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications* Nat Commun 10(1): 4403
- 109. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5* J Gen Virol 36(1): 59-74
- 110. Riekehr WM, Sander S, Pick J, Tidow H, Bauche A, Guse AH, Fliegert R (2022) *cADPR does not activate TRPM2* Int J Mol Sci 23, 3163
- 111. GeneScript Codon Usage Frequency Table (chart) Tool (https://www.genscript.com/tools/codon-frequency-table) Expression Host Organism: Human – abgerufen am 05.04.22

- 112. McHugh D, Flemming R, Xu SZ, Perraud AL, Beech DJ (2003) *Critical intracellular Ca*<sup>2+</sup> *dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation* J Chem Biol 278(13): 11002-06
- 113. Kühn FJP, Watt JM, Potter BL, Lückhoff A (2019) *Different substrate specificities of the two ADPR binding sites in TRPM2 channels of Nematostella vectensis and the role of IDPR* Sci Rep 9(1): 4985
- 114. Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, Kang S, Smith MK, Schmitz C, Knowles HM, Ferrais D, Li W, Zhang L, Stoddard BL, Scharenberg AM (2005) *Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels* J Biol Chem 280(7): 6138-48
- 115. Guse AH, Berg I, da Silva CP, Potter BV, Mayr GW (1997) *Ca*<sup>2+</sup> *Entry Induced by Cyclic ADP-ribose in intact T-Lymphcytes* J Biol Chem 272(13): 8546-50
- 116. Guse AH, da Silva CP, Berg I, Skapenko AL, Weber K, Heyer P, Hohenegger M, Ashamu GA, Schulze-Koops H, Potter BV, Mayr GW (1999) *Regulation of calcium signalling in T-lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-Ribose* Nature 398(6722): 70-73
- 117. Sander S, Pick J, Gattkowski E, Fliegert R, Tidow H (2022) *The crystal structure of TRPM2 MHR1/2 domain reveals a conserved Zn*<sup>2+</sup>*-binding domain essential for structural integrity and channel activity* Protein Sci 31(6): e4320
- 118. Sethi JK, Empson RM, Bailey VC, Potter BV, Galione A (1997) 7-Deaza-8-bromocyclic ADP-ribose, the first membrane-permeant, hydrolysis-resistant cyclic ADP-ribose antagonist J Biol Chem 272(26): 16358-63
- 119. Walseth TH, Lee JC (1993) *Synthesis and characterization of antagonists of cyclic-ADPribose-induced Ca*<sup>2+</sup> *release* Biochim Biophys Acta 1178(3): 235-42
- 120. Lin S, Gasmi L, Xie Y, Ying K, Gu S, Wang Z, Jin H, Chao Y, Wu C, Zhou Z, Tang R, Mao Y, McLennan AG (2002) *Cloning, expression and characterisation of a human Nudix hydrolase specific for 5'-diphosphoribose (ADP-ribose)* Biochim Biophys Acta 1594(1): 127-35
- 121. Kirchberger T, Wagner G, Xu J, Cordiglieri C, Wang P, Gasser A, Fliegert R, Bruhn S, Flügel A, Lund FE, Zhang LH, Potter BVL, Guse AH (2006) *Cellular effects and metabolic stability of N1-cyclic inosine diphosphoribose and its derivatives* Br J Pharmacol 149(4): 337-44
- 122. Koldenkova VP, Nagai T (2013) *Genetically encoded Ca*<sup>2+</sup> *indicators: Properties and evaluation* Biochim Biophys Acta 1833(7): 1787-97

# 7 Gefahrenstoffe

# 7.1 Gefahrenstoffe und ihre GHS-Zuordnung

Gefahrenstoff	H-Sätze	P-Sätze	
2'-deoxy-ADPR	Nicht vollständig untersuchter Stoff		
2-APB	H302	P261	
	H315	P264	
	H319	P270	
	H335	P271	
		P280	
		P301+312	
		P302+352	
		P304+340	
		P305+351+338	
		P312	
		P321	
		P330	
		P332+313	
		P337+313	
		P362	
		P405	
		P501	
8-Br-ADPR	Nicht vollständig untersuchter Stoff	Nicht vollständig untersuchter Stoff	
8-Br-cADPR	H315	P261	
	H319	P302+352	
	H335	P305+351+338	
ADPR	H315	P261	
	H319	P264	
	H335	P271	
		P280	
		P302+352	
		P305+351+338	

#### Tabelle 7.1: Gefahrenstoffe und ihre GHS-Zuordnung

Bradford Reagenz	H290	P264
Dradiord Reagenz		D270
	П314	P270
	H370	P271
		P260
		P280
		P234
		P304+340
		P303+361+353
		P305+351+338
		P330+331
		P405
		P403
		P406
		P402
cADPR	Nicht vollständig untersuchter Stoff	1
Calciumchlorid	H319	P305+351+338
cIDPR	Nicht vollständig untersuchter Stoff	
DTT	H302	P261
	H315	P305+351+338
	H310	100010011000
	11317	
	11355	<b>D2</b> 90
EDIA		P204+240
	П332 Ца <b>7</b> 2	P304+340
	П3/3	P312
		P305+351+338
		P337+313
Essigsäure	H226	P210
	H314	P280
		P301+330+331
		P303+361+353
		P305+351+338
G418	H317	P261
	H334	P280
		P342+311
JetPEI Lösung	H319	P264
	H315	P280
		P302+352
		P305+351+338
		P332+313
		P362
Kanamycin	H360d	P260
		P308+313

Mangan(II)-chlorid	H301	P273
	H318	P280
	H373	P301+310+330
	H411	P305+351+338+310
		P314
Methanol	H225	P210
	H301+311+331	P233
	370	P280
		P301+310
		P303+361+353
		P304+340+311
MOPS	H315	P261
	H319	P305+351+338
	H335	
N1-cIDPR	Nicht vollständig untersuchter Stoff	
PB-ADPβ-R <sup>Ac</sup>	Nicht vollständig untersuchter Stoff	
Penicillin/Streptomycin	H302	P260
	H317	P270
	H334	P302+352
	H361d	P308+311
		P501
SDS	H228	P210
	H302+332	P261
	H315	P280
	H318	P302+352
	H335	P305+351+338
	H412	
Tetracyclin	H302	P301+312
	H315	P302+352
	H361d	P308+313
	H362	
Tris	H315	P261
	H319	P305+351+338
	H335	
Trypanblau	H350	P201
		P308+313
Wasserstoffperoxid	H271	P280
	H302	P305+351+338+310
	H314	
	H332	
	H335	
	H412	

## 7.2 H- und P-Sätze

#### Physikalische Gefahren

H225: Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.

H226: Gefahr durch Feuer, Druckstoß oder Sprengstücke; erhöhte Explosionsgefahr, wenn das Desensibilisierungsmittel reduziert wird.

H271: Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.

H290: Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

#### Gesundheitsgefahren

H301: Giftig bei Verschlucken.

H301+311+331: Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt und beim Einatmen.

H302: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

H302+332: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken und Einatmen.

H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

H315: Verursacht Hautreizungen.

H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

H318: Verursacht schwere Augenschäden.

H319: Verursacht schwere Augenreizung.

H332: Gesundheitsschädlich bei Einatmen.

H334: Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.

H335: Kann die Atemwege reizen.

H350: Kann Krebs erzeugen

H360d: Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

H361d: Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.

H362: Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.

H370: Schädigt die Organe

H371: Kann die Organe schädigen

H373: Kann bei längerer oder wiederholter Exposition die Organe schädigen

#### Umweltgefahren

H411: Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

#### Prävention

P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P210: Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen.

P233: Behälter dicht verschlossen halten.

P234: Nur in Originalverpackung aufbewahren.

P260: Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.

P261: Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.

P264: Nach Gebrauch Hände/Haut gründlich waschen.

P270: Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.

P271: Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.

P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

P280: Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

## Reaktionen

P301+310: BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen.

P301+310+330: BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen und Mund ausspülen.

P301+312: BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein

GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen.

P301+312+330: BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein

GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen und Mund ausspülen.

P302+352: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser/... waschen.

P303+361+353: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen, Haut mit Wasser abwaschen [oder duschen].

P304+340: BEIM EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.

P304+340+311: BEIM EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen, GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen.

P305+351+338: BEI BERÜHRUNG MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang vorsichtig mit Wasser ausspülen. Evtl. vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

P305+351+338+310: BEI BERÜHRUNG MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang vorsichtig mit Wasser ausspülen. Evtl. vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen.

P308+313: BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P308+311: BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P312: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen.

P314: Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P321: Besondere Behandlung Erste Hilfe Anweisungen beachten.

P330: Mund ausspülen.

P330+331: Mund ausspülen, KEIN Erbrechen herbei führen.

P332+313: Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P337+313: Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P362: Kontaminierte Kleidung ausziehen.

### Aufbewahrung

P402: An einem trockenen Ort aufbewahren.P403: An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.P405: Unter Verschluss aufbewahren.P406: In korrosionsbeständigem Behälter aus Edelstahl mit resistenter, innererBeschichtung aufbewahren

### Entsorgung

P501: Inhalt/Behälter zugelassener Müllentsorgungsstelle zuführen.

#### 7.3 Entsorgung

Alle verwendeten Chemikalien wurden den GHS Gefahren- und Sicherheitshinweisen entsprechend verwendet. Lösungsmittel und kontaminierte Abfälle wurden in gekennzeichneten Gefäßen gesammelt und den Sicherheitshinweisen entsprechend entsorgt. Genetisch veränderte Organismen wurden nach dem Gentechnikgesetz behandelt und vor ihrer Entsorgung autoklaviert.

# 8 Danksagung

Diese Arbeit wäre niemals ohne die Mithilfe vieler weiterer Beteiligter entstanden, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte:

An erster Stelle steht dabei natürlich mein Doktorvater, Ralf Fliegert. Vielen Dank für die Vergabe eines interessanten Themas, für die Geduld, mir das Patchen beizubringen und immer wieder auf Fehlersuche zu gehen, wenn Mal wieder der Wurm drin war, für wichtige Hinweise, interessante Diskussionen und die Zeit, die du dir genommen hast, auch wenn eigentlich immer tausend andere Dinge zu tun gewesen wären.

Danke an die Kollegen vom Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, insbesondere an Frederike Kulow für die Klonierung und Bereitstellung sowie den Expressionsnachweis des Reportersystems, Stefanie Etzold, Anke Löhndorf, Swati Ohol und Jelena Pick, mit denen die engste Zusammenarbeit bestand, aber auch an die Leute aus N45, auch wenn wir einander pandemiebedingt selten gesehen haben – besonders an Andreas Bauche für die Hilfe mit der Durchführung der HPLC-Experimente bei allen möglichen, technischen Schwierigkeiten.

Mein Dank geht außerdem an Chris Meier vom Institut für organische Chemie der Universität Hamburg für die Mitbetreuung meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an die Mitglieder von SFB-Projekt A05 vom Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg. Simon Sander, für die produktive Zusammenarbeit an der MHR1/2 Domäne, Ellen Gattkowski für die Hilfe mit Patch Clamp Experimenten bei 37°C, allen beiden, Henning Tidow und Maria García Alai für spannende Diskussionen über TRPM2.

Bei dem gesamten Sonderforschungsbereich 1328 möchte ich mich für interessante (wenn auch manchmal zu lange) Science Afternoons und Retreats mit faszinierenden Vorträgen, Diskussionen und einer tollen Stadtrallye durch Timmendorf bedanken.

Zudem gilt mein Dank meiner Familie. Meinen Eltern, meinem Bruder Constantin, seiner Freundin Annika und meinen besten Freunden, Viktoria und Sascha. Ohne die Care-Pakete, die lieben Worte und das Wissen, dass ihr an mich glaubt, hätte die Kombination aus Doktorarbeit und Pandemie mich vermutlich vor dem Ziel besiegt.

# 9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 27.09.2022

W.M.L

Winnie Maria Riekehr