

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Fakultät für Medizin

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

**Bedeutung von Kationenkanälen für die Regulation und die  
Homöostase des Immunsystems**

Habilitationsschrift  
zur Erlangung der *Venia legendi*  
für das Fach  
Pharmakologie und Toxikologie

vorgelegt

von

Dr. rer. nat. Susanna Zierler

München, 2018

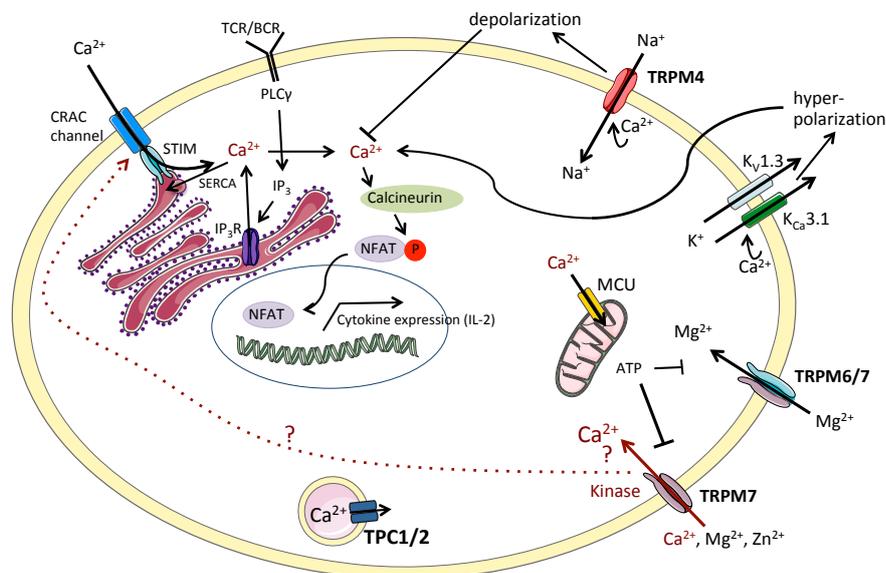
## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>2</b>
1.1. Ionenkanäle und deren Bedeutung für die Funktion des Immunsystems	2
1.2. Regulation des Speicher-abhängigen Kalzium-Einstroms in Lymphozyten	4
1.3. Melastatin-ähnliche Enzym-gekoppelte <i>Transient-Receptor-Potential</i> -Kanäle als Signalmoleküle im Immunsystem	7
1.4. Zielsetzung	9
<b>2. Ergebnisse und Diskussion eigener Arbeiten</b>	<b>10</b>
2.1. Regulation des Speicher-abhängigen Kalzium-Einstroms in Lymphozyten und Chronischer Lymphatischer Leukämie	10
2.2. Rolle von Enzym-gekoppelten TRP-Kanälen im Magnesium-Haushalt und der daraus resultierende Einfluss auf das Immunsystem	13
2.3. Funktion der TRPM7-Kinase bei allergischer Hypersensitivität und bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems	16
2.4. TRPM7 als pharmakologische Zielstruktur	22
<b>3. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>23</b>
3.1. Regulation des SOCE durch Kationenkanäle und deren Einfluss auf die Aktivierung und Proliferation hämatopoetischer Zellen	23
3.2. Funktion von Kationenkanälen bei allergischer Hypersensitivität	24
3.3. Kationenkanäle regulieren die Homöostase des Immunsystems	25
<b>4. Literaturverzeichnis</b>	<b>27</b>
<b>5. Danksagung</b>	<b>32</b>
<b>6. Curriculum Vitae</b>	<b>33</b>
<b>7. Verzeichnis eigener Publikationen</b>	<b>36</b>
<b>Anhang</b>	<b>38</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Ionenkanäle und deren Bedeutung für die Funktion des Immunsystems

Das Immunsystem schützt den Körper gegen Pathogene, während es körpereigene Strukturen toleriert. Ein Ungleichgewicht von pro- und anti-entzündlichen Mechanismen hat schwere Folgen für den Organismus. Daher ist eine feine Regulation der Immunantwort essentiell. Einerseits müssen eindringende Pathogene effektiv eliminiert werden; andererseits muss eine Selbst-Toleranz aufrecht erhalten bleiben, um Autoimmunerkrankungen zu verhindern. Studien zu auftretenden Immundefekten aufgrund fehlender Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) oder Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ )-Ströme heben die Bedeutung Kationen-vermittelter Signalwege für die Funktion von hämatopoetischen Zellen hervor (Feske *et al.*, 2005; Lacruz & Feske, 2015; Li *et al.*, 2011; Stritt *et al.*, 2016; Zierler *et al.*, 2017). Der kapazitive Kalziumeinström über CRAC (Calcium Release Activated Calcium) Kanäle, ist dabei eines der am besten charakterisierten frühen Signale, die zur Aktivierung von Immunzellen führen. Die Rolle anderer Kationenkanäle ist dagegen weniger gut untersucht, obwohl sie genauso wichtig für eine erfolgreiche Immunantwort sind. Ionenkanäle, wie Kalium ( $\text{K}^+$ )-Kanäle, Chlorid ( $\text{Cl}^-$ )-Kanäle, und Melastatin-ähnliche Transient-Receptor-Potential (TRPM) Kationenkanäle bilden ein Netzwerk, das Leukozyten-Aktivierung genau reguliert. Diese Ionenkanäle steuern die Initiierung, die Intensität und die Dauer der Kalziumsignale (Zierler *et al.*, 2017).



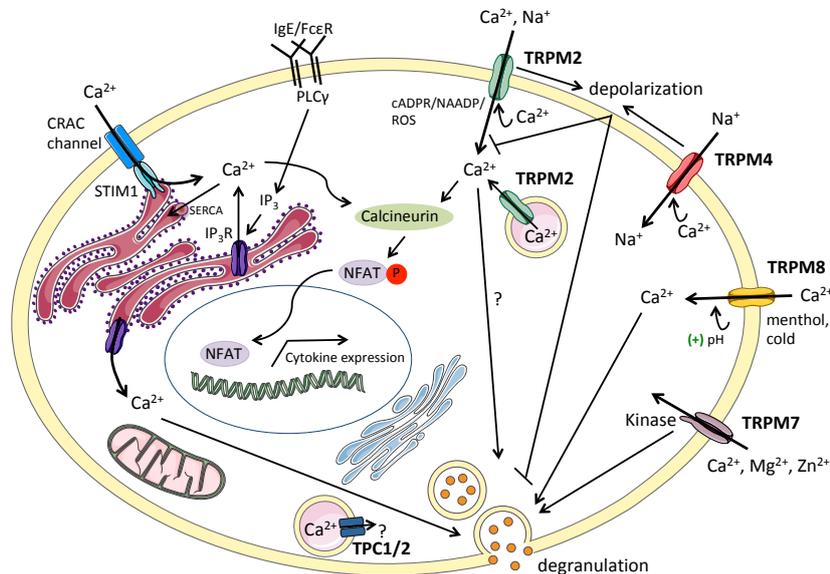
**Abbildung 1: Bedeutung von Kationenkanälen für  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Lymphozyten.** Antigenerkennung des TCR oder BCR führt zu PLC $\gamma$ -Aktivierung und IP<sub>3</sub>-Produktion. Dies stimuliert die Speicherentleerung über den IP<sub>3</sub>R im ER, gefolgt von, durch CRAC-Kanäle vermittelten, SOCE. Die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  löst die Translokation von NFAT und dadurch die Aktivierung von Lymphozyten aus. Die Dauer und Intensität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wird von K<sub>v</sub>1.3 und K<sub>Ca</sub>3.1-Kanälen gesteuert, indem sie über Hyperpolarisation des Membranpotentials die treibende Kraft für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom gewährleisten. TRPM4 trägt über eine Depolarisation zu den typischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen bei. TRPM7 reguliert SOCE vermutlich über seine Kinase-Domäne. TRPM6 könnte den Mg<sup>2+</sup>-Einstrom über Bildung von Heteromultimeren mit TRPM7 regulieren. Abkürzungen: TCR, T-Zellrezeptor; BCR, B-Zellrezeptor; PLC, Phospholipase C; IP<sub>3</sub>, Inositol 1,4,5-Trisphosphat; IP<sub>3</sub>R, IP<sub>3</sub>-Rezeptor; ER, Endoplasmatisches Retikulum; SERCA, Seroendoplasmatische Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; STIM, Stromal-Interaktions-Molekül; SOCE, Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom; CRAC,  $\text{Ca}^{2+}$ -Release-Activated  $\text{Ca}^{2+}$ ; NFAT, Nuclear Factor of Activated T Cells; K<sub>v</sub>1.3, Spannungs-abhängiger Kaliumkanal; K<sub>Ca</sub>3.1,  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter Kaliumkanal; MCU, Mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter; TPC, Two-Pore Channel. Modifiziert nach Zierler *et al.*, 2017.

In Lymphozyten ist die anhaltende Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) essentiell für die Aktivierung von NFAT (*Nuclear Factor of Activated T Cells*), die daraus resultierende Interleukin-2 (IL-2) Genexpression, sowie die Zellteilung (Abb. 1) (Zierler *et al.*, 2017). Der  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch CRAC-Kanäle ist bei depolarisiertem Membranpotentialen reduziert und somit entsteht ein Feedback-Mechanismus, bei dem Membrandepolarisation durch  $Ca^{2+}$ -Einstrom, die  $Ca^{2+}$ -Signale abschwächt. Insbesondere kontrollieren zwei  $K^+$ -Kanäle, der spannungs-abhängige  $K_v1.3$ -Kanal (auch KCNA3 (HUGO Nomenklatur)) und der  $Ca^{2+}$ -aktivierte  $IK_{Ca1}$ -Kanal (auch KCNN4 (HUGO Nomenklatur), oder  $K_{Ca3.1}$  (International Union of Pharmacology Nomenklatur) (Gutman *et al.*, 2003)), intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Signale indem sie das Membranpotential von Lymphozyten regulieren (DeCoursey *et al.*, 1984). Der relative Beitrag von  $K_v1.3$  und  $K_{Ca3.1}$  an der Regulation dieses Prozesses hängt von ihrem Expressionslevel in den unterschiedlichen Lymphozyten-Subtypen ab (Ghanshani *et al.*, 2000; Wulff *et al.*, 2003; Wulff *et al.*, 2004). Dabei steuern  $K_v1.3$  und  $K_{Ca3.1}$ -Kanäle, gemeinsam mit TRPM4, durch eine rasche Änderung des Membranpotentials den  $Ca^{2+}$ -Einstrom und tragen so zu den charakteristischen  $Ca^{2+}$ -Oszillationen in Lymphozyten bei (Kerschbaum *et al.*, 1997; Launay *et al.*, 2004). Unterschiedliche Frequenzen oder Amplituden dieser  $Ca^{2+}$ -Oszillationen aktivieren verschiedene Transkriptionsfaktoren und steuern so weitere zelluläre Signalwege (Berry *et al.*, 2018; Kar *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2010). Wir konnten kürzlich in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten zeigen, dass auch das Kanal-Enzym TRPM7 über seine enzymatische Aktivität  $Ca^{2+}$ -Signale in Lymphozyten steuert (Abb. 1, siehe auch 2.1, Abb. 7) (Beesetty *et al.*, 2018; Faouzi *et al.*, 2017; Romagnani *et al.*, 2017).

Unabhängig vom  $Ca^{2+}$ -Einstrom von außen können lokale  $Ca^{2+}$ -Signale allein durch die Entleerung von intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speichern wie dem ER oder dem endo-lysosomalen Kompartiment entstehen. Hier sind die erst kürzlich identifizierten sogenannten *Two-Pore-Channels* (TPCs) von großer Bedeutung. Diese kommen vorwiegend in endo-lysosomalen Vesikeln vor und steuern vermutlich deren Fusion und Transport (Davis *et al.*, 2012; Grimm *et al.*, 2017; Kilpatrick *et al.*, 2013). In zytotoxischen T-Lymphozyten wurde gezeigt, dass die TPCs für die Exozytose lytischer Vesikel und somit deren Effektorfunktion essentiell sind, indem sie das für die Fusion nötige  $Ca^{2+}$  vermitteln (Davis *et al.*, 2012).

Auch für Zellen des angeborenen Immunsystems sind Kalziumsignale wesentlich für deren Aktivierung, Exozytose und Sekretion, Einwanderung in den Entzündungsherd, sowie Phagozytose (Zierler *et al.*, 2017). Mastzellen haben aufgrund ihrer strategischen Lokalisation in allen Organen im Körper nahe der Blut- und Lymphgefäße sowie Neuronen eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von Entzündungsreaktionen. In Abbildung 2 ist am Beispiel der Mastzellen die Rolle von Kationenkanälen im angeborenen Immunsystem skizziert. Klassischerweise werden Mastzellen über IgE-Quervernetzung aktiviert, was in weiterer Folge zur Translokation des Stromal-Interaktions-Moleküls (STIM1) und zur Aktivierung von CRAC-Kanälen führt. CRAC-Kanäle und STIM1 beeinflussen Effektorfunktionen von Mastzellen *in vitro*, als auch *in vivo* (Baba *et al.*, 2008; Vig *et al.*, 2008). TRP Proteine (z.B. TRPM2, TRPM4) haben eine ähnlich wichtige Bedeutung für die Vermittlung von zellulären  $Ca^{2+}$ -Signalen und damit der Mastzell-Aktivierung (Oda *et al.*, 2013; Vennekens *et al.*,

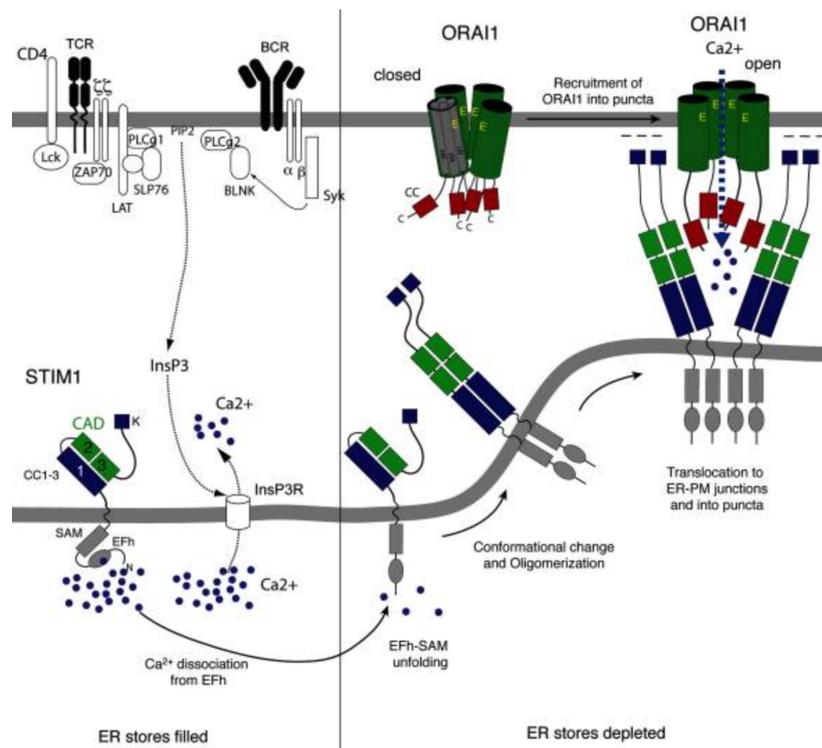
2007). Wir konnten zeigen, dass auch in Mastzellen das Kanal-Enzym TRPM7 eine essentielle Rolle für deren Funktion und Exozytose einnimmt (sh. 2.3.) (Zierler *et al.*, 2016). Außerdem konnten wir in einem zur Begutachtung eingereichten Manuskript zeigen, dass der endo-lysosomale TPC1 für die Funktion von Mastzellen *in vitro* und *in vivo* essentiell ist (sh. 3.2., Abb. 17, Arlt *et al.*, eingereicht).



**Abbildung 2: Bedeutung von Kationenkanälen für Mastzellen.** Aktivierung von Mastzellen über IgE Quervernetzung, führt in weiterer Folge zur Aktivierung der PLC $\gamma$  und schließlich zur Abspaltung von IP $_3$ , ER Ca $^{2+}$ -Speicher-Entleerung und Ca $^{2+}$ -Einstrom über CRAC-Kanäle. Der intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Anstieg löst die Fusion zahlreicher sekretorischer Vesikel und somit die Sekretion von Mastzell-Mediatoren, wie Histamin, aus. Abkürzungen: IgE, Immunglobulin E; Fc $\epsilon$ R, Fragment-kristallin- $\epsilon$  Rezeptor; cADPR, zyklische Adenindinukleotidphosphat-Ribose; NAADP, Nicotinsäure-ADP; ROS, reactive Sauerstoff-Radikale. Modifiziert nach Zierler *et al.*, 2017.

## 1.2. Regulation des Speicher-abhängigen Kalzium-Einstroms in Lymphozyten

Wie bereits erwähnt, sind Kalziumsignale für eine effektive Immunantwort essentiell. Der kapazitive Kalziumeinstrom über CRAC-Kanäle ist hierbei für eine anhaltende Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration verantwortlich. Die Rezeptor-vermittelte Stimulation von Immunzellen führt zur Produktion von Inositol-3-Phosphat (IP $_3$ ) und folglich zur Entleerung der intrazellulären ER Ca $^{2+}$ -Speicher über den IP $_3$ -Rezeptor (IP $_3$ R). Fällt die Ca $^{2+}$ -Konzentration im ER ab, dissoziiert das Ca $^{2+}$  von der luminalen EF-Hand am sensorischen Protein STIM1 ab, welches sich daraufhin „entfaltet“ und mit anderen STIM1-Proteinen zusammenlagert (Liou *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005). Diese STIM1-Multimere wandern dann innerhalb des ERs zu Regionen nahe der Plasmamembran, wo sie sich zu sogenannten „Punkten“ formieren und mit den CRAC-Molekülen 1 bis 3 (CRACM1-3 oder ORAI1-3) (Feske *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006; Yeromin *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006) in der Plasmamembran über die „CRAC Channel Activation Domain“ (CAD, auch SOAR, *STIM1 Orai Activating Region*; OSAF, *Orai-Activating Small Fragment*) interagieren (Muik *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009). Dadurch werden die CRAC-Kanäle geöffnet und der Ca $^{2+}$ -Einstrom, I $_{CRAC}$ , ausgelöst. Dieser Vorgang wird als "*Store-Operated Ca $^{2+}$ -Einstrom*" (SOCE) bezeichnet (Abb. 3) (Feske *et al.*, 2012).

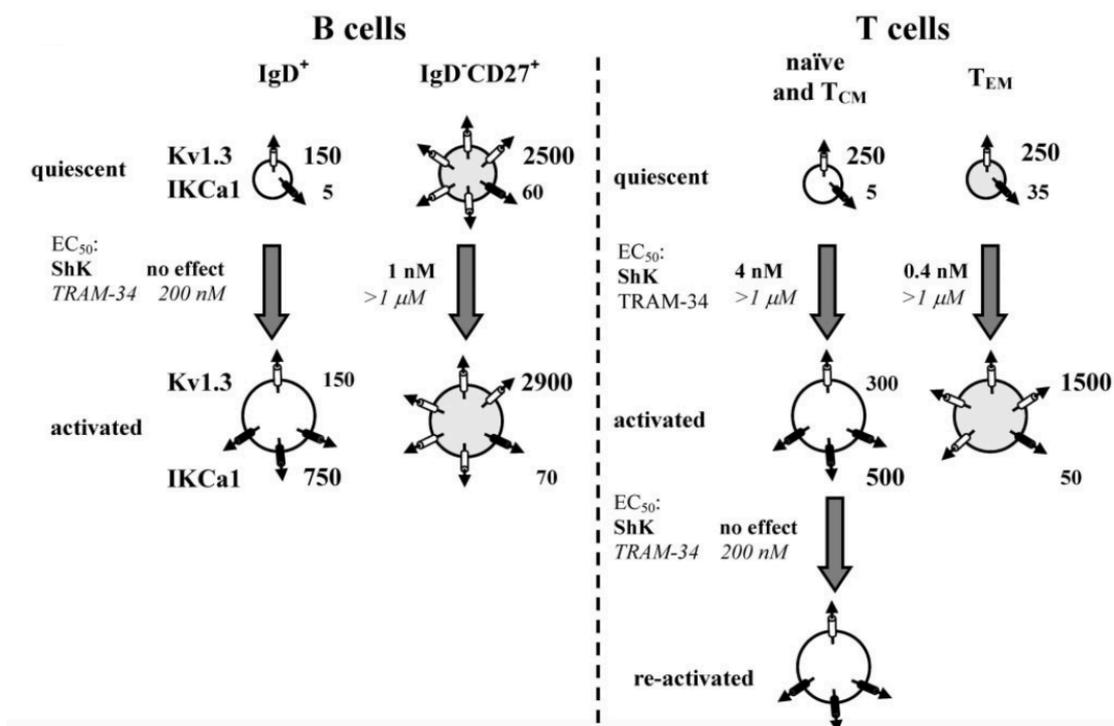


**Abbildung 3: Speicherabhängiges Öffnen und Schließen der CRACM/ORAI-Kanäle über STIM1.** Aufgrund des Abfalls der luminalen ER  $[Ca^{2+}]$  ( $[Ca^{2+}]_{ER}$ ), dissoziiert  $Ca^{2+}$  von der EF-Hand am N-Terminus von STIM1 ab, wodurch sich STIM1 entfaltet, Multimere ausbildet und zur Plasmamembran wandert, wo es über die Bindung der CAD-Region an CRACM/Orai-Kanäle  $I_{CRAC}$  auslöst. Abkürzungen: SAM, steriles  $\alpha$ -Motiv; CC, *coiled-coil*; InsP3, Inositol-1,4,5-Trisphosphat; T- und B-Zellrezeptor-assoziierte Kinasen: Lck, Zap17, LAT, SLP76, Syk, BLNK. Abbildung aus Feske *et al.*, 2012.

Die Relevanz von SOCE in T-Zellen wird durch die Tatsache deutlich, dass Patienten, deren SOCE defekt ist, keine Immunreaktion mehr aufbauen können und eine "Schwere Kombinierte Immundefizienz" (SCID) entwickeln (Lacruz & Feske, 2015; Li *et al.*, 2011). Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die  $Ca^{2+}$ -Signale in T-Lymphozyten regulieren, ist daher im Hinblick auf effizientere Therapieverfahren unerlässlich. Wir konnten eine einzelne, konservierte Aminosäure im N-Terminus von CRACM1/3 bzw. Orai1/3 identifizieren, die für STIM1-abhängiges Öffnen essentiell ist (sh. 2.1.) (Lis & Zierler *et al.*, 2010).

Damit ein anhaltender Anstieg des  $[Ca^{2+}]_i$  gewährleistet werden kann, benötigen die Zellen Mechanismen, um das Membranpotential wieder zu hyperpolarisieren. T- und B-Lymphozyten verwenden hierfür  $K_v1.3$  und  $K_{Ca}1.3$ -Kanäle.  $K_v$ -Kanäle öffnen, wenn die Membran depolarisiert und schließen, wenn das Membranpotential hyperpolarisiert.  $K_v$ -Kanäle besitzen sechs Transmembrandomänen (TMs) wobei die ersten vier Helices (S1–S4) die Spannungs-Sensor-Domäne (VSD) bilden. Die letzten beiden Helices (S5–S6) bilden die Poren-Domäne. Die VSD erkennt Änderungen im Membranpotential, was zu einer, den Kanal öffnenden, Faltungsänderung führt (Kuang *et al.*, 2015). Der  $K_{Ca}3.1$ -Kanal ist Spannungs-unabhängig und wird ausschließlich über die Bindung von  $Ca^{2+}$  an Calmodulin, das konstitutiv mit dem C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit assoziiert ist, geöffnet (Sforza *et al.*, 2018).  $K_{Ca}3.1$ -Kanäle werden ebenfalls aus sechs TMs, mit einem  $K^+$ -Selektivitätsfilter zwischen S5 und S6, geformt. Nahe des zytoplasmischen C-Terminus befinden sich die CaM-bindende Region und eine *coiled-coil*-Region (Ji *et al.*, 2018).

Interessanterweise sind sowohl T- als auch B-Zellen in der Lage, ihre Kaliumkanal-Expressionsmuster während ihrer Differenzierung zu verändern (Abb. 4) (Beeton *et al.*, 2006; Wulff *et al.*, 2004). Sogenannte Effektor-Gedächtnis T-Zellen ( $T_{EM}$ ,  $CCR7^-$   $CD45RA^-$ ) ändern ihr Kaliumkanal-Profil und exprimieren nach Aktivierung signifikant höhere Mengen an  $K_v1.3$  und eine niedrigere Anzahl an  $K_{Ca}1.3$ -Kanälen als naive oder Zentrale-Gedächtnis T-Zellen ( $T_{CM}$ ). Nach wiederholter Antigen-Stimulation *in vitro* differenzieren naive T-Zellen in  $K_v1.3^{hoch}$  und  $K_{Ca}1.3^{niedrig}$   $T_{EM}$  Zellen und das potente  $K_v1.3$ -Kanäle blockierende Peptid der Seeanemone *Stichodactyla helianthus* (ShK) unterdrückt die Proliferation von  $T_{EM}$  Zellen ohne naive T- oder  $T_{CM}$  Zellen zu beeinflussen.  $T_{EM}$  Zellen könnten zur Pathogenese bei T-Zell-abhängigen Autoimmunerkrankungen beitragen, indem sie in entzündete Gewebe einwandern und dort umgehend ihre Effektorfunktion ausüben. Selektive Inhibition von  $K_v1.3$  ist daher ein vielversprechender Therapieansatz für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose, Rheumatoide Arthritis oder Typ-1 Diabetes Mellitus (Beeton *et al.*, 2006; Wulff *et al.*, 2003). Eine ähnliche Modulation der Kaliumkanal-Expression vollbringen humane B-Zellen während ihrer Differenzierung von naiven zu Gedächtnis-B-Zellen. Naive und  $IgD^+CD27^+$  Gedächtnis-B-Zellen in Ruhe exprimieren wenige  $K_v1.3$ - und  $K_{Ca}1.3$ -Kanäle und erhöhen die  $K_{Ca}3.1$ -Kanal-Expression 45-fach nach Aktivierung mit keiner Änderung in der  $K_v1.3$ -Expression. Im Gegensatz zu ruhenden exprimieren "class-switched" Gedächtnis-B-Zellen hohe Mengen von  $K_v1.3$ -Kanälen und behalten diesen  $K_v1.3^{hoch}$  Status nach Aktivierung bei (Abb. 4) (Wulff *et al.*, 2004).



**Abbildung 4: Graphische Darstellung der  $K_v1.3$ - und  $IKCa1$ - (hier  $IKCa3.1$ ) Expression in naiven und Gedächtnis-B- und T-Zellsubtypen.** Dargestellt sind die  $EC_{50}$  Werte für die Inhibition der Proliferation durch den  $K_v1.3$ -Blocker ShK und den  $IKCa3.1$ -Blocker TRAM-34. Entnommen aus Wulff *et al.*, 2004.

Entsprechend ihrer Kaliumkanal-Expression wird die Proliferation von naiven und  $IgD^+CD27^+$  Gedächtnis-B-Zellen durch den spezifischen  $K_{Ca}1.3$ -Kanal-Blocker TRAM-

34, aber nicht durch ShK inhibiert. Im Gegensatz dazu wird die Zellteilung von IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen von ShK aber nicht TRAM-34 blockiert. Daher können spezifische K<sub>v</sub>1.3 und K<sub>Ca</sub>1.3-Kanal-Blocker für eine therapeutische Modulation von selektiven Lymphozyten-Subtypen in Immunerkrankungen eingesetzt werden (Wulff *et al.*, 2004). Ob diesen beiden Kanälen aber auch eine entscheidende funktionelle Rolle bei der Aktivierung und Proliferation von Leukämiezellen zukommt, ist noch weitgehend unbekannt. In Kooperation mit Prof. Dr. Hubert Kerschbaum (Universität Salzburg) & Prof. Dr. Richard Greil (LIMCR, SALK) konnten wir zeigen, dass die pharmakologische Blockade der K<sub>Ca</sub>1.3 Kanäle in Leukämiezellen deren Proliferation hemmt (sh. 2.1.) (Grossinger *et al.*, 2014).

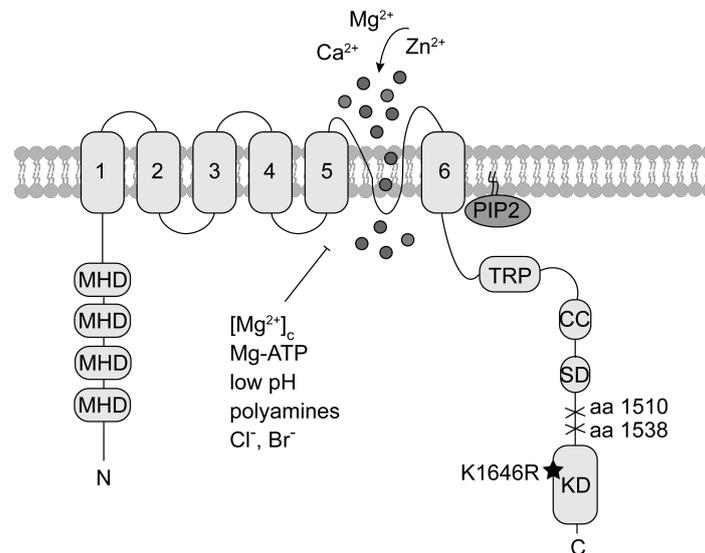
### **1.3. Melastatin-ähnliche Enzym-gekoppelte *Transient-Receptor-Potential*-Kanäle als Signalmoleküle im Immunsystem**

Vor der Entdeckung von CRACM bzw. Orai-Proteinen als molekulare Komponenten des SOCE (Feske *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006) wurden Vertreter der TRP-Superfamilie als Speicher-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle diskutiert (DeHaven *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2006; Kerschbaum & Cahalan, 1999; Kozak *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2008).

Die TRP-Kanal-Superfamilie umfasst 29 funktionell charakterisierte TRP-Kanäle im humanen Genom, die in folgende Kanal-Familien eingeteilt werden: TRPC („C“ für klassisch), TRPV („V“ für vanilloid), TRPM („M“ für Melastatin), TRPN („N“ für NOMPC, kein Mechanorezeptor Potential C), TRPA, („A“ für Ankyrin, ein Adapterprotein), TRPP („P“ für Polyzystisch, Mutation kann zu polyzystischen Nierenerkrankung führen) und TRPML („ML“ für Mucolipin). TRP-Kanäle haben eine gemeinsame Struktur und setzen sich aus sechs TM-Regionen, sowie einem cytosolischen N-Terminus mit der charakteristischen TRP-Domäne und einem cytosolischen C-Terminus zusammen (Abb. 5). Klassischer Weise wurde den TRP-Kanälen eine sensorische Rolle zugesprochen (Venkatachalam & Montell, 2007). Die physiologische Funktion von TRP-Kanälen ist aber viel weitreichender und reicht von vaskulärer Integrität (Dietrich *et al.*, 2010), Vesikelfusion, Migration, Differenzierung bis hin zur Zytokin-Expression (Nadolni & Zierler, 2018). Zahlreiche Mutationen im humanen Genom wurden in TRP-Kanal-Genen identifiziert, was ihre pathophysiologische Rolle deutlich hervorhebt (Bassi *et al.*, 2000; Chubanov *et al.*, 2004; Mochizuki *et al.*, 1996; Reiser *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2000; Winn *et al.*, 2005). In Kollaboration mit Prof. Dr. Bernhard Nieswandt und Dr. Attila Braun (Universität Würzburg) konnten wir in Thrombozytopenie-Patienten eine ursächliche TRPM7-Gen-Variante identifizieren, die zur Inhibition der TRPM7-Kanalaktivität führt (sh. 2.2.) (Stritt *et al.*, 2016).

Die Melastatin-ähnlichen TRP-Kanäle, TRPM6 und TRPM7, sind nahe verwandte „Schwesterproteine“, die beide eine für zweiwertige Kationen-selektive TRPM-Kanalpore fusioniert mit einer C-terminalen Serin/Threonin-Kinase besitzen (Chubanov *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Nadler *et al.*, 2001; Nadolni & Zierler, 2018; Schmitz *et al.*, 2005). TRPM7-Kanal- und -Kinaseaktivität sind voneinander abhängig, indem das Mg<sup>2+</sup>, das durch die Kanalpore einströmt, für die Kinase-Funktion notwendig ist. Für die einzigartige Kanal-Kinase (ChaK1) waren bisher nur wenige *in vitro* Substrate, wie

Annexin A1 (ANXA1), Myosin II, und PLC $\gamma$ 2, bekannt (Nadolni & Zierler, 2018). Wir konnten kürzlich mit Hilfe eines Kinase-defizienten Mausmodelles (*Trpm7<sup>R/R</sup>*), bei dem durch eine Punktmutation am Lysin 1646 (K1646R) die Kinaseaktivität ausgeschaltet wurde, das erste native TRPM7-Kinase Substrat identifizieren (sh. 2.3.) (Romagnani *et al.*, 2017). Beide TRPM-Homologe können Hetero-Multimere bilden und sind für die Aufrechterhaltung der Mg<sup>2+</sup>-Homöostase verantwortlich (Chubanov *et al.*, 2016; Chubanov *et al.*, 2007; Ryazanova *et al.*, 2010; Schmitz *et al.*, 2003).



**Abbildung 5: TRPM7-Topologie.** TRPM7-Proteine bestehen aus sechs Transmembranregionen (TM 1-6) mit der Kanalpore zwischen dem 5. und 6. Segment. Innerhalb des N-Terminus befinden sich für TRPM-Familienmitglieder charakteristische Melastatin-Homologie-Domänen (MHD). Der zytosmatische C-Terminus enthält die *Transient-Receptor-Potential*-Domäne (TRP), eine *coiled-coil*-Domäne (CC) und eine Kinase-Substrat-Domäne (SD) oberhalb der atypischen Serin/Threonin Kinase-Domäne (KD). Eine Mutation in der katalytischen Region der Kinase (K1646R) inhibiert die Kinaseaktivität ohne dabei die Kanalaktivität zu beeinträchtigen. Deletion der KD an unterschiedlichen Aminosäuren (aa) führt zu erhöhter oder reduzierter Kanalaktivität. Die schwarzen Sterne zeigen den Locus der Punktmutation, und die Kreuze die Kinase-Deletionen an. TRPM7 wird über die Depletion des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), physiologische, freie, zytosolische Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen [Mg<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>, Mg-ATP, Polyamine, niedrigen pH und Chlorid (Cl<sup>-</sup>) und Bromid (Br<sup>-</sup>) Konzentrationen negativ reguliert. Entnommen aus Nadolni & Zierler, 2018.

*In vitro*, ist die TRPM7-Aktivität notwendig für die Proliferation von Lymphozyten, sofern nicht zusätzlich Mg<sup>2+</sup> ins Kulturmedium gegeben wird (Sahni & Scharenberg, 2008; Zierler *et al.*, 2011). Dies lässt vermuten, dass auch Mg<sup>2+</sup> Lymphozyten-Antworten reguliert. Der tatsächliche Beitrag von TRPM7 zur Regulation der Mg<sup>2+</sup>-Homöostase wurde aber kontrovers diskutiert. So wurde postuliert, dass die genetische Deletion von TRPM7 die embryonale Entwicklung stört, ohne dabei aber die Homöostase von Mg<sup>2+</sup> zu beeinflussen (Jin *et al.*, 2008). Unsere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass TRPM7 neben der zellulären auch für die systemische Mg<sup>2+</sup>-Homöostase wichtig ist (sh. 2.2.) (Chubanov *et al.*, 2016; Ryazanova *et al.*, 2010). TRPM7 selbst wird von extrazellulären Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen ([Mg<sup>2+</sup>]<sub>e</sub>) beeinflusst 1) durch Kompensationen auf Expressionsniveau (Paravicini *et al.*, 2009) als auch 2) auf funktioneller Ebene durch direkte Effekte auf die Ionenkanalleitfähigkeit (Nadler *et al.*, 2001; Ryazanova *et al.*, 2010; Schmitz *et al.*, 2003). Bei Reduktion der [Mg<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> verdoppelt sich die TRPM7-Stromamplitude (Ryazanova *et al.*, 2010). Physiologisch wird TRPM7 durch intrazelluläres freies Mg<sup>2+</sup> ([Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), Mg-ATP, Polyamine, niedrigen pH und Chlorid (Cl<sup>-</sup>) und Bromid (Br<sup>-</sup>) Konzentrationen reguliert (Abb. 5). Wie genau

die TRPM7-Kanal- oder Enzym-Funktion aktiviert bzw. reguliert wird, ist jedoch noch vollkommen unbekannt (Nadolni & Zierler, 2018). Wir konnten kürzlich zeigen, dass die Bildung von TRPM6/M7 Hetero-Multimere, deren Regulation durch  $[Mg^{2+}]_i$  und Mg-ATP verändert (sh. 2.2.) (Chubanov *et al.*, 2016; Ferioli *et al.*, 2017). Pro-entzündliche Erkrankungen gehen oft mit niedrigen systemischen  $[Mg^{2+}]$  einher, was möglicherweise auf eine veränderte TRPM6- und/oder TRPM7-Funktion zurückgeführt werden kann (Elamin & Tuvemo, 1990; Fort & Lifshitz, 1986; Martin, 1969; Yasui & Ota, 1992; Yasui *et al.*, 1990). Uns ist es gelungen, die TRPM7-Kinase Aktivität als essentielle Komponente und mögliche pharmakologische Zielstruktur bei allergischer Hypersensitivität und Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen zu identifizieren (sh. 2.3.) (Romagnani *et al.*, 2017; Zierler *et al.*, 2016).

#### 1.4. Zielsetzung

Ziel meines Habitationsprojektes war es, die Bedeutung und Regulation von Kationenkanälen auf zellulärer Ebene, sowie im Zusammenspiel der Immunantwort *in vivo* besser zu verstehen und dadurch mögliche neue pharmakologische Zielstrukturen für pro-entzündliche Erkrankungen zu identifizieren.

Im ersten Teil meiner Arbeit sollte die Rolle von Kationenkanälen, die den, für die Aktivierung und Proliferation von Immunzellen essentiellen Speicher-abhängigen  $Ca^{2+}$ -Einstrom (SOCE), regulieren, ermittelt werden. Hierfür wurde die Interaktion der molekularen Komponenten des SOCE, CRACM1/Orai1 und STIM1 analysiert. Außerdem wurde der Einfluss des Kanal-Enzyms TRPM7 auf  $Ca^{2+}$ -Signale, während der Aktivierung von Lymphozyten, und auf deren Proliferation, untersucht. Schließlich wurde die Rolle der, den kapazitativen SOCE regulierenden  $K^+$ -Kanäle ( $K_v1.3$ ,  $K_{Ca3.1}$ ), bei der Aktivierung und Proliferation von chronischen Leukämiezellen erforscht.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Rolle von Enzym-gekoppelten TRP-Kanälen im  $Mg^{2+}$ -Haushalt und deren daraus resultierender Einfluss auf das Immunsystem analysiert werden. Hierfür wurden verschiedene TRPM6 und TRPM7 Mausmutanten, sowie Proben einer Patienten-Kohorte mit einer Punktmutation in der TRPM7 Kanal-Domäne, untersucht.

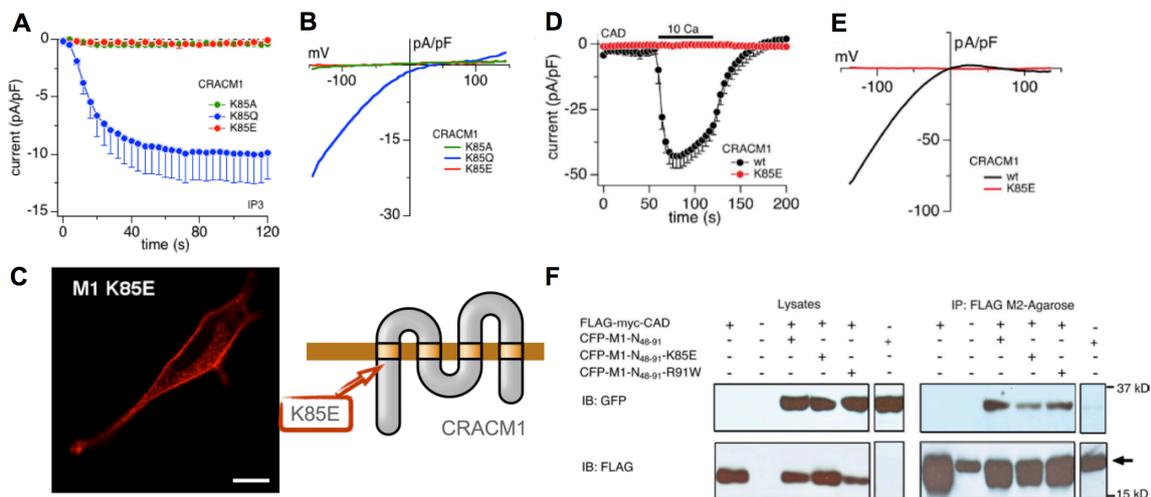
Schwerpunkt des dritten Teils der Arbeit war es, die Funktion der TRPM7-Kinase gegenüber der Kanalaktivität in Immunreaktionen abzugrenzen. Hierfür wurde die Rolle des Kanal-Enzyms TRPM7 bei allergischer Hypersensitivität sowie dessen Einfluss bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems mit Hilfe geeigneter Mausmodelle ermittelt. Insbesondere sollte festgestellt werden, ob sich TRPM7-Kanal oder -Kinase als pharmakologische Zielstrukturen für Therapien gegen Hypersensitivität oder pro-entzündliche Erkrankungen eignen. Als Ergänzung dazu wurden Screening-Verfahren mit einer Bibliothek aus Meeres-Extrakten durchgeführt, in denen neue pharmakologische Modulatoren für die TRPM7-Kinase identifiziert werden sollten. Identifizierte Substanzen sollten dann als neue molekulare Werkzeuge dazu eingesetzt werden, die TRPM7-Kanal-Funktion besser zu charakterisieren, und im Idealfall humane Immun-Erkrankungen zu behandeln.

## 2. Ergebnisse und Diskussion eigener Arbeiten

### 2.1. Regulation des Speicher-abhängigen Kalzium-Einstroms in Lymphozyten und Chronischer Lymphatischer Leukämie

(Lis & Zierler *et al.*, 2010, Romagnani *et al.* 2017, Grössinger *et al.*, 2014)

In den letzten Jahren wurden viele Teile des Puzzles, bezüglich der Interaktion der Moleküle die SOCE regulieren, aufgedeckt (Derler *et al.*, 2016; Fahrner *et al.*, 2018; Groschner *et al.*, 2018). Innerhalb der CRACM/ORAI-Proteine wird der zytoplasmischen C-terminalen *coiled-coil*-Region eine wichtige Rolle für die Bindung an STIM1 zugesprochen und eine einzelne Punktmutation innerhalb dieser Region verhindert deren Interaktion (Muik *et al.*, 2008; Navarro-Borelly *et al.*, 2008; Frischau *et al.*, 2009). Die Rolle des N-Terminus von CRACM1 bei dem STIM1/CRACM1 Signalkomplex ist jedoch weitaus weniger gut verstanden. Deletion der gesamten N-terminalen Region von CRACM1 inhibiert CRAC-Aktivierung, aber nicht die Zusammenlagerung mit STIM1 (Li *et al.*, 2007). Wir haben daher die strukturellen Anforderungen der STIM1-vermittelten CRACM1- und CRACM3-Aktivierung über deren N-Termini genauer untersucht. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, konnten wir zeigen, dass ein 20 Aminosäure-langer Bereich der N-terminalen Region nahe der Plasmamembran, wichtig für das Öffnen von CRACM1 und CRACM3 ist. Insbesondere, konnten wir eine hoch konservierte Aminosäure (K85 in CRACM1 und K60 in CRACM3) in der N-terminalen Region nahe der ersten TM-Domäne identifizieren, die für STIM1-abhängiges Öffnen von CRAC-Kanälen verantwortlich ist. Ein Austausch der Aminosäure Lysin (K) an Position 85 in CRACM1 (Abb. 6) bzw. 60 in CRACM3 zu Glutaminsäure (E) (K85E und K60E) unterdrückte Speicher-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme via  $\text{IP}_3$  vollständig (Abb. 6).

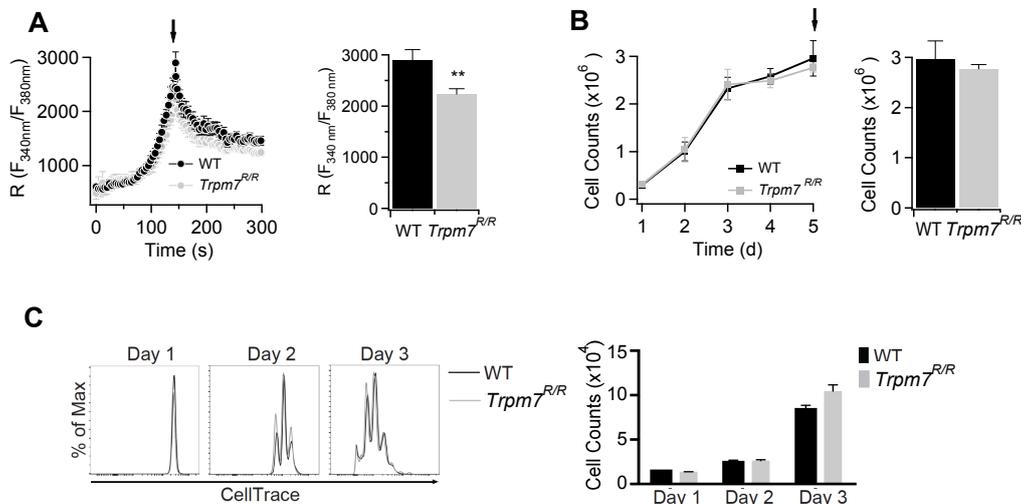


**Abbildung 6: Ein Austausch von Lysin zu Glutaminsäure (K85E) in CRACM1 blockiert  $\text{I}_{\text{CRAC}}$  Aktivierung trotz Bindung an STIM1.** (A-C) STIM1-HEK293 Zellen wurden mit CRACM1 oder CRACM1-Mutanten-Konstrukten transfiziert und  $\text{I}_{\text{CRAC}}$  über  $\text{IP}_3$ -Perfusion ( $20 \mu\text{M}$ ) ausgelöst. (A) Normalisierte Stromdichten extrahiert bei  $-80 \text{ mV}$  wurden gegen die Zeit aufgetragen. Daten zeigen die Leck-subtrahierten Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (B) Normalisierte Strom-Spannungskurven extrahiert bei  $120 \text{ s}$ . (C) Links: Subzelluläre Lokalisation der CRACM1 Kanalmutante K85E. Repräsentative konfokale LSM-Aufnahme einer immunzytochemischen Färbung mittels anti-HA Antikörper und Alexa659 konjugierten Detektionsantikörper. Der Balken repräsentiert  $10 \mu\text{m}$ . Rechts: Topologische Darstellung von CRACM1. Der Pfeil zeigt die Lokalisation der mutierten Aminosäure an. (D-F) HEK293 Zellen wurden mit FLAG-myc-CAD und CRACM1 oder CRACM1-K85E-Konstrukten transfiziert. (D) Normalisierte Stromdichten von CAD-vermittelten CRAC-Strömen bei  $-80 \text{ mV}$  wurden gegen die Zeit aufgetragen. Die Zellen wurden in

Ca<sup>2+</sup>-freier Lösung gehalten. Der Balken zeigt den Zeitraum der Applikation von 10 mM Ca<sup>2+</sup> an. (E) Normalisierte Strom-Spannungskurven extrahiert bei 180 s. (F) Representative Co-Immuno-Präzipitations-Analyse (IP) von HEK293 Zellen transfiziert mit dem FLAG-myc-CAD-Konstrukt und verschiedenen kurzen N-terminalen-Konstrukten (CFP-M1-N<sub>48-91</sub>) von CRACM1. Die entsprechenden Lysate sind links dargestellt. Abkürzungen: wt, Wildtyp; LSM, Laser-Scanning Mikroskopie; IB, Immuno-Blotting; CAD, CRAC Channel Activation Domain. Modifiziert nach Lis & Zierler *et al.*, 2010.

Zusammenfassend, ist es uns gelungen, eine einzelne, konservierte Aminosäure im N-Terminus von CRAC-Kanälen als kritische Komponente für Speicher-abhängiges Öffnen von CRAC-Kanälen zu identifizieren (Lis & Zierler *et al.*, 2010).

Da der Enzym-gekoppelte TRPM7-Kanal ähnliche physiologische Charakteristika, in Bezug auf seine Leitfähigkeit und pharmakologischen Eigenschaften, aufweist wie I<sub>CRAC</sub>, wurde er anfangs für die molekulare Komponente des CRAC-Kanals gehalten (Kerschbaum & Cahalan, 1999). Mittlerweile ist aber klar geworden, dass TRPM7 nicht Speicher-abhängig geöffnet werden kann (Faouzi *et al.*, 2017; Kozak *et al.*, 2002). Dennoch ist das Kanal-Enzym in jüngster Zeit wieder in funktionellen Zusammenhang mit SOCE gebracht worden (Beesetty *et al.*, 2018; Faouzi *et al.*, 2017; Gotru *et al.*, 2018; Matsushita *et al.*, 2005). Wir konnten zeigen, dass TRPM7-Kinase-defiziente T-Lymphozyten eine normale Kanal-Funktion und unveränderte systemische Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen aufweisen. Interessanterweise, zeigten aber Kinase-defiziente (*Trpm7*<sup>R/R</sup>) CD4<sup>+</sup> T-Zellen, als Reaktion auf die Stimulation mit Antikörpern gegen CD3 und CD28, reduzierten SOCE. Die Proliferation über 5 Tage war allerdings unverändert (Abb. 7) (Romagnani *et al.*, 2017).

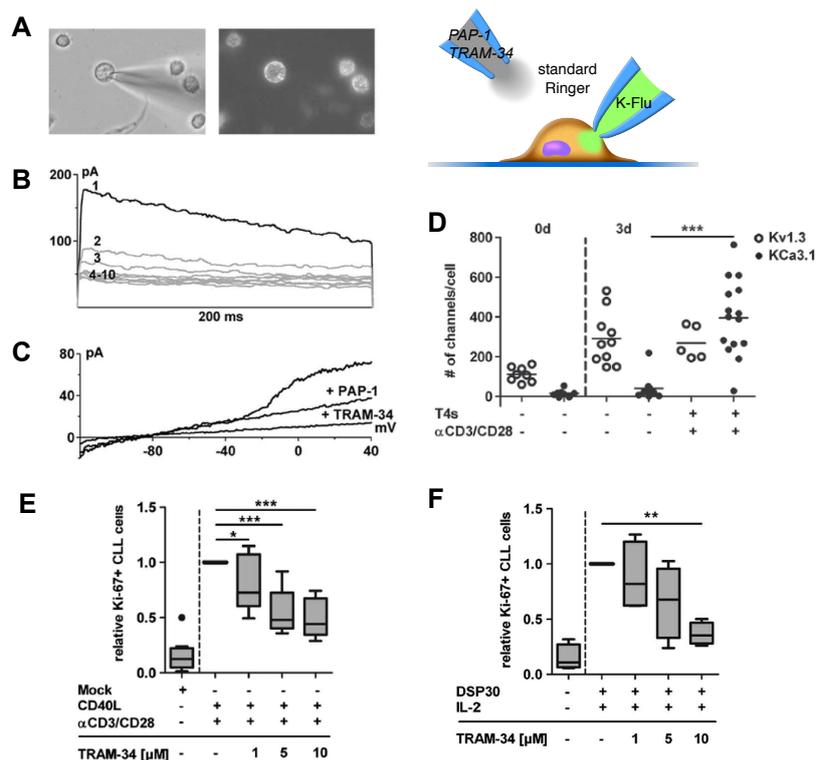


**Abbildung 7: Einfluss der TRPM7-Kinase auf Ca<sup>2+</sup>-Signale und Proliferation in CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** (A) Ratiometrische Ca<sup>2+</sup>-Messungen von Wildtyp (WT, schwarz, n = 28) und *Trpm7*<sup>R/R</sup> (grau, n = 31) CD4<sup>+</sup> T-Zellen stimuliert mit  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 Antikörpern wurden gegen die Zeit (s) aufgetragen. Insgesamt wurden je 3 Mäuse verwendet. Das Balkendiagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. extrahiert bei 150 s. (rechte Spalte). (B) T-Zell-Proliferation dargestellt in Zellzahlen aufgetragen gegen die Zeit (Tagen, d). CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert aus WT (schwarz, n = 3-4) und *Trpm7*<sup>R/R</sup> (grau, n = 3-4) wurden mit  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 Antikörpern stimuliert. Insgesamt wurden je 5 Tiere verwendet. In der rechten Spalte sind die mittleren Zellzahlen  $\pm$  S.E.M. am Tag 5 dargestellt. (C) Repräsentative Überlagerung von CellTrace Profilen von WT (schwarz) und *Trpm7*<sup>R/R</sup> (grau) naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen stimuliert mit  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 Antikörpern für 3 Tage (links) und statistische Auswertung für die jeweiligen Tage (rechts). Daten sind repräsentative Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. \*\* P<0.01. Entnommen aus Romagnani, *et al.*, 2017.

Ähnliche Befunde berichteten Beesetty *et al.* und zeigten, dass Rezeptor-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Signale in *Trpm7*<sup>R/R</sup> T-Zellen reduziert waren. Jedoch beobachteten sie eine Reduktion der T-Zell-Proliferation als Reaktion auf Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)- und Ionomycin-Behandlung während der ersten 24 Stunden, welche dann aber

nach 48 und 72 Stunden kompensiert wurden (Beesetty *et al.*, 2018). Wie genau die TRPM7-Kinase SOCE reguliert, ob und wie die Kinase die Proliferation von Lymphozyten beeinflusst und wie sich das auf deren Differenzierung und Effektorfunktionen auswirkt, ist Gegenstand unserer derzeitigen Untersuchungen.

Da die Kontrolle des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in Lymphozyten essentiell ist, und dieser durch  $\text{K}^+$ -Kanäle reguliert werden kann, steigt das therapeutische Interesse an Kaliumkanal-Blockern, um so die Zellproliferation bei Autoimmunerkrankungen und Krebs zu unterdrücken. Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) ist eine heterogene lymphoproliferative Krebserkrankung von sich klonal-ausbreitenden  $\text{CD5}^+\text{CD19}^+$  B-Zellen. Es wird angenommen, dass sich CLL-Zellen von aktivierten Antigen-erfahrenen Vorläuferzellen ( $\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ ) ableiten. Im peripheren Blut befindet sich die Mehrheit der CLL-Zellen im Zellzyklus-Arrest, wohingegen sich die CLL-Zellen in lymphoiden Organen teilen und täglich maßgebliche Mengen an Krebszellen produzieren (Burger, 2011; Messmer *et al.*, 2005). Ungünstiger Weise, sind CLL-Zellen in den lymphoiden Nischen gegen die zytotoxischen Effekte von vielen Chemotherapeutika geschützt und können damit folgenschwere Rückfälle auslösen. Wenn die Proliferation von Leukämiezellen vom  $\text{K}^+$ -Ausstrom getrieben wird, könnten selektive Kaliumkanal-Blocker von klinischem Nutzen sein, um B-Zell-Neoplasmen anzugreifen (Grossinger *et al.*, 2014).



**Abbildung 8:  $\text{IK}_{\text{Ca}3.1}$ -Blockade durch TRAM-34 inhibiert CLL-Proliferation.** (A) Patienten CLL-Zellen ( $n = 9$ ) wurden mittels Immun-Fluoreszenz (IF) Färbung von  $\text{CD19}$  identifiziert und im Ganz-Zell-Modus gepatcht (links: Hellfeld-Bild; rechts: Fluoreszenz-Bild). (B) Zehn identische depolarisierende Spannungsschritte wurden von  $-80$  bis  $+40$  mV jede 1 s gesetzt und zeigen die sog. "use-dependent inactivation" von  $\text{K}_v1.3$ . Die Zahlen von 1 – 10 stellen die Anzahl der Pulse dar. (C) Aufeinanderfolgende Spannungsrampen von  $-120$  bis  $+40$  mV und  $1 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$  visualisieren  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  Ströme. Störende  $\text{K}_v1.3$ -Ströme wurden mit  $200$  nM PAP-1 eliminiert und  $500$  nM TRAM-34 blockierte verbleibende  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Ströme. (D) Ganz-Zell-Patch-Clamp Aufnahmen von CLL-Zellen zeigen die Hochregulation von  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanälen in der Plasmamembran. CLL-Zellen wurden drei Tage mit  $\text{CD4}^+$  T-Zellen stimuliert und mit Kontrollzellen, die ohne  $\text{CD4}^+$  T-Zellen kultiviert wurden, verglichen (Zahl der Patienten:  $n = 3$ ). Der

Berechnung der Kanäle pro Zelle wurde eine Einzelkanal-Leitfähigkeit von 11 pico-Siemens bei +40 mV zu Grunde gelegt. (E) Dosis-Steigerung von TRAM-34 mit 1, 5 oder 10  $\mu\text{M}$  ( $n = 10$ ) zeigte eine Konzentrations-abhängige Reduktion der Ki-67-Expression in CLL-Zellen; Werte wurden auf unbehandelte proliferierende Kontrollen normalisiert. (F) CLL-Zellen wurden nach 24 h Vorinkubation mit CpG mit steigenden Konzentrationen von TRAM-34 behandelt, bevor IL-2 zugegeben wurde ( $n = 4$ ). Die Ki-67-Expression von CLL-Zellen reduzierte sich Konzentrations-abhängig. Proben wurden auf aktivierte Kontrollen ohne TRAM-34-Behandlung normiert. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ . Modifiziert nach Grossinger *et al.* 2014.

Folglich haben wir zuerst  $\text{K}^+$ -Kanäle in ruhenden und proliferierenden primären CLL-Zellen mit Hilfe von *in vitro* Stimulation mit Stroma-Zellen und autologen  $\text{CD4}^+$  T-Zellen (T4) analysiert und dann die Kaliumkanal-Expression mit Proliferationsmarker in lymphoiden Gewebe und peripheren CLL-Zellen korreliert (Abb. 8). Patch-Clamp Analysen von primären CLL-Zellen zeigten einen Spannungs-abhängigen  $\text{K}^+$ -Strom, der durch den  $\text{K}_v1.3$ -spezifischen Blocker PAP-1 inhibiert werden konnte, sowie einen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{K}^+$ -Strom, der durch TRAM-34 blockierbar war (Abb. 8A-C). Die Berechnung der Kanäle pro Zelle ergab ca. 14  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  und 110  $\text{K}_v1.3$ -Kanäle pro CLL-Zelle vor der Stimulation, 40  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  und 290  $\text{K}_v1.3$ -Kanäle in CLL-Zellen, die ohne autologe  $\text{CD4}^+$  T-Zellen (T4) kultiviert wurden, und 395  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  und 268  $\text{K}_v1.3$ -Kanäle in CLL-Zellen, die mit aktivierten T4 Zellen für 3 Tage co-kultiviert wurden (Abb. 8D). Dies entspricht einem 11-fachen Anstieg des  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}/\text{K}_v1.3$ -Verhältnisses, verglichen mit dem von Kontroll-CLL-Zellen. Schließlich konnten wir die Sensitivität der CLL-Zell-Proliferation auf Kaliumkanal-Blockade in zwei unterschiedlichen Proliferations-Modellen darstellen (Abb. 8E,F). TRAM-34 aber nicht PAP-1 reduzierte Ki-67 Expression in CLL-Zellen, wodurch der Einfluss von  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanälen bei der Aktivierung des Zellzyklus deutlich wird.  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanäle scheinen daher vielversprechende Zielstrukturen für die Behandlung von CLL darzustellen. Dies wurde durch zahlreiche *in vivo* Tiermodelle und klinische Studien auch weiter bestätigt (Grossinger *et al.*, 2014). Unsere aktuellen Untersuchungen zeigen auch vielversprechende inhibierende Effekte auf die Aktivierung und Proliferation von CLL-Zellen durch TRPM7-Blockade (sh. 3.1).

## 2.2. Rolle von Enzym-gekoppelten TRP-Kanälen im Magnesium-Haushalt und der daraus resultierende Einfluss auf das Immunsystem

(Ryazanova *et al.*, 2010; Chubanov *et al.*, 2016; Stritt *et al.*, 2016; Ferioli, Zierler *et al.*, 2017)

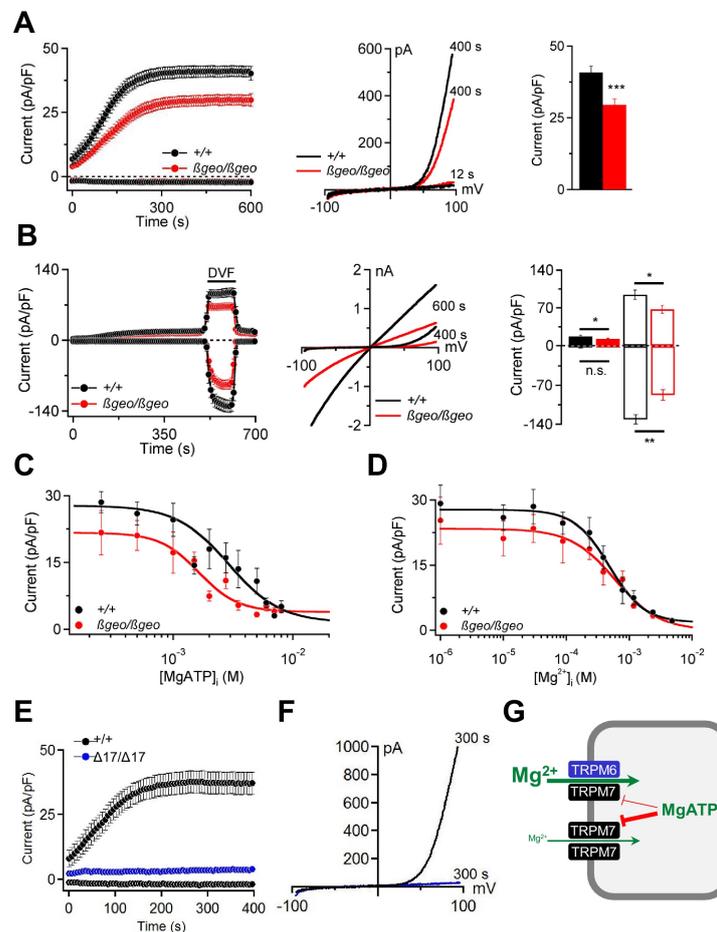
Die transiente Änderung der intrazellulären Ionenkonzentrationen steuert eine Vielzahl an zellulären Reaktionen wie die Zellteilung, die Zellaktivierung und den Zelltod. Neben  $\text{Ca}^{2+}$  ist hier auch  $\text{Mg}^{2+}$  von zentraler Bedeutung. Betrachtet man die Tatsache, dass eine zu niedrige  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration im Körper neurodegenerative Erkrankungen, Verlust der Muskelaktivität, bestimmte Krebserkrankungen und allergische Reaktionen fördert (de Baaij *et al.*, 2015), wird die Wichtigkeit deutlich, die Mechanismen, die den systemischen  $\text{Mg}^{2+}$ -Haushalt kontrollieren, aufzuklären. Wir konnten zeigen, dass die Aufnahme von  $\text{Mg}^{2+}$  auf ein Zusammenspiel von TRPM6 und TRPM7 im Darm beruht. Ursprünglich wurde TRPM6 als Regulator der systemischen (Chubanov *et al.*, 2007; Voets *et al.*, 2004) und TRPM7 als Vermittler der zellulären  $\text{Mg}^{2+}$ -Homöostase (Nadler *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2003) identifiziert. In Kooperation mit Dr. Vladimir Chubanov und Prof. Dr. Thomas Gudermann (LMU München) konnten wir die essentielle, nicht redundante Rolle von TRPM6 bei der Regulation der organismischen

Mg<sup>2+</sup>-Balance bestätigen. Die TRPM6-Aktivität in der Plazenta ist für die embryonale Entwicklung essentiell, während TRPM6 im Dünndarm notwendig ist, um die organismische Mg<sup>2+</sup>-Balance in erwachsenen Mäusen aufrecht zu erhalten. Interessanterweise fanden wir, dass in erwachsenen *Trpm6*-defizienten Tieren, neben anderen Organdefekten, die lymphoiden Organe stark degradiert waren. Der Thymus der Mutante war nur noch rudimentär vorhanden und die Cortex-Regionen waren kaum erkennbar. In der Milz der *Trpm6*-defizienten Mäuse war die rote Pulpa ebenfalls stark reduziert. Orale Gabe von Mg<sup>2+</sup> hat diesen Phänotyp wieder aufgehoben, was darauf hin deutet, dass tatsächlich die Hypomagnesiämie dafür verantwortlich ist. Zusammenfassend, resultiert die genetische Deletion von TRPM6 in metabolischen Defekten und einem verfrühten Altersphänotyp (Chubanov *et al.*, 2016).

Der Beitrag von TRPM7 zur Regulation der systemischen Mg<sup>2+</sup>-Homöostase wird jedoch kontrovers diskutiert. Es wurde postuliert, dass die genetische Deletion von TRPM7 die Embryonalentwicklung stört, ohne dabei die Mg<sup>2+</sup>-Homöostase zu beeinträchtigen (Jin *et al.*, 2008). Unsere Befunde machen jedoch deutlich, dass TRPM7, für die systemische Regulation von Mg<sup>2+</sup> in Mäusen, essentiell ist. Wir konnten in Übereinstimmung mit Jin *et al.* zeigen, dass Mäuse, denen TRPM7 fehlt (*Trpm7*<sup>-/-</sup>), nicht lebensfähig sind und während ihrer Embryonalentwicklung (Tag 6.5) sterben. Mäuse, bei denen die Enzym-Domäne von TRPM7 genetisch entfernt wurde, sind ebenfalls nicht lebensfähig (*Trpm7*<sup>ΔK/ΔK</sup>). Heterozygote Tiere (*Trpm7*<sup>+ΔK</sup>) entwickeln jedoch ein Krankheitsbild namens Hypomagnesiämie, bei dem der Mg<sup>2+</sup>-Haushalt gestört ist. Interessanterweise haben diese Tiere auch eine verstärkte Prädisposition für allergische Erkrankungen (Ryazanova *et al.*, 2010). Es ist bekannt, dass niedrige, systemische Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen mit einer Verschlechterung von systemischen entzündlichen und allergischen Reaktionen einher gehen (Malpuech-Brugere *et al.*, 2000). Um dies zu überprüfen, haben wir ein etabliertes Mausmodell der allergischen Kontakt-Hypersensitivität in *TRPM7*<sup>+ΔK</sup> Mäusen untersucht. Hierfür wurden Oxazolone-Sensitivierungs-Experimente durchgeführt. Wir fanden, dass *Trpm7*<sup>+ΔK</sup> Mäuse tatsächlich eine erhöhte Oxazolone-Sensitivität gegenüber WT Tieren besitzen und dies in Abhängigkeit von unterschiedlichen Mg<sup>2+</sup>-Diäten noch verstärkt werden konnte (Ryazanova *et al.*, 2010). Welcher Rolle der TRPM7-Kinaseaktivität bei diesem Phänotyp zukommt, haben wir in weiterer Folge mit Hilfe eines zusätzlichen Mausmodells untersucht (sh. 2.3.) (Zierler *et al.*, 2016).

Es wurde gezeigt, dass TRPM6 mit TRPM7 heteromere Kanalkomplexe bilden können. Ob TRPM6 aber auch funktionelle homomere Kanäle ausbildet, ist noch umstritten (Chubanov *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014). Unsere jüngsten elektrophysiologischen Analysen von primären Trophoblasten-Stammzellen zeigten, dass *Trpm6*-defiziente Stammzellen stark reduzierte TRPM7-Ströme entwickelten, im Vergleich zu WT. Intrazelluläres und extrazelluläres Mg<sup>2+</sup> reguliert die Aktivität von TRPM7-Kanälen, wobei [Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und Mg·ATP einen negativen Feedback-Mechanismus auf TRPM7 ausüben, während extrazelluläres Mg<sup>2+</sup> als permeabler Blocker von TRPM7 fungiert (Abb. 5) (Nadolni & Zierler, 2018). Wir fanden, dass in *Trpm6*-defizienten Stammzellen, die Ströme einer stärkeren Konzentrations-abhängigen Inhibition durch zytosolisches Mg·ATP unterlagen, was darauf hindeutet, dass Mg·ATP ein physiologischer Regulator von heteromeren TRPM6/M7-Kanälen ist, während in

*Trpm7*-defizienten Stammzellen sich keine Ströme entwickelten. Daher könnten native TRPM6-Kanäle in enger Zusammenarbeit mit TRPM7 stehen, um die  $Mg^{2+}$ -Aufnahme durch TRPM7 von seinem negativen Feedback durch  $Mg\cdot ATP$  zu entkoppeln (Chubanov *et al.*, 2016; Zierler *et al.*, 2017). In Kooperation mit Dr. Vladimir Chubanov konnten wir diese Hypothese mit Hilfe transienter Überexpression von murinen TRPM6 und TRPM7 in verschiedenen Zellmodellen bestätigen. Wir zeigten, dass TRPM6 und TRPM7 die Eigenschaften von heteromeren TRPM6/7 Kanalkomplexen unterschiedlich regulieren: Einerseits führt die Anwesenheit von TRPM7 zu einer reduzierten  $Mg^{2+}$ -Sensitivität von funktionell exprimierten homomeren TRPM6-Kanälen; andererseits entkoppelt TRPM6, TRPM7 von seiner starken Inhibition durch  $Mg\cdot ATP$ . Somit erlaubt die Zusammenlagerung von TRPM6 mit TRPM7 eine höhere konstitutive Aktivität der heteromeren TRPM6/7-Kanäle in Anwesenheit von physiologischen  $Mg^{2+}$ - und  $Mg\cdot ATP$ -Konzentrationen, und bietet daher eine mechanistische Grundlage für den erhöhten  $Mg^{2+}$ -Transport in Epithelzellen (Ferioli *et al.*, 2017). TRPM6 und TRPM7 scheinen also gemeinsam die systemische  $Mg^{2+}$ -Homöostase zu regulieren.



**Abbildung 9: Charakterisierung von TRPM6/M7-ähnlichen Strömen in *Trpm6*- und *Trpm7*-defizienten TS-Zellen.** (A) Links: Ganz-Zell-Ströme gemessen bei  $-80$  mV und  $+80$  mV über die Zeit (s) in *Trpm6*<sup>+/+</sup> (n=22) und *Trpm6*<sup>βgeo/βgeo</sup> (n=22) TS-Zellen. Mitte: Repräsentative Strom-Spannungs-Verhältnisse gewonnen bei 12 s und 400 s. Rechts: Balkendiagramme der mittleren Stromdichten bei  $+80$  mV (400 s). (B) Messungen an Kontroll- (n = 16) und *Trpm6*-defizienten (n = 14) TS-Zellen wurden durchgeführt wie in (A), außer dass die extrazelluläre Lösung gegen bivalent-freie Lösung (DVF, sh. Balken) ausgetauscht wurde. (C, D) Dosis-abhängige Reduktion der Ströme ( $+80$  mV, 400 s) durch  $[MgATP]_i$  und  $[Mg^{2+}]_i$ , (n = 4-18 Zellen pro Konzentration). (E, F) Ganz-Zell Ströme von *Trpm7*<sup>+/+</sup> (n = 15) und *Trpm7*<sup>Δ17/Δ17</sup> (n = 10) TS-Zellen wurden analog zu (A, B) untersucht und ausgewertet. Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*\* P < 0.001; \*\* P < 0.01; \* P < 0.05; n.s., nicht signifikant verändert; n

= Zellzahl. (G) Vorgeschlagenes Modell für die molekulare Rolle von TRPM6 in Epithelzellen. Entnommen aus Chubanov *et al.*, 2016.

In Kooperation mit Dr. Attila Braun und Prof. Dr. Bernd Nieswandt konnten wir kürzlich eine Patienten-Kohorte identifizieren, die eine die Kanal-Funktion beeinträchtigende, Punktmutation in TRPM7 trägt. Mit Hilfe von Gewebe-spezifischen *Trpm7*-defizienten Mäusen (*Trpm7<sup>fl/fl-Pf4Cre</sup>*) konnten wir zeigen, dass TRPM7 die Blutplättchen-Funktion über die Regulation der zellulären  $Mg^{2+}$ -Homöostase und zytoskelettischer Myosin IIA-Aktivität steuert. Die Träger der humanen Mutation in *TRPM7* (p.C721G) leiden unter Makrothrombozytopenie und Arterieller Fibrose. Der Defekt in der Plättchen-Biogenese wird hauptsächlich durch Veränderungen des Zytoskeletts hervorgerufen, was eine fehlerhafte Pro-Plättchen-Bildung von *Trpm7*-defizienten Megakaryozyten zur Folge hat. Dieser Phänotyp kann durch  $Mg^{2+}$ -Zufuhr aufgehoben werden. Im Gegensatz dazu zeigen homozygote Kinase-defiziente *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäuse normale Plättchen-Zahlen, Größe und Morphologie. Dies lässt vermuten, dass eher die Abwesenheit von TRPM7-Kanälen, als die der Kinaseaktivität für die Makrothrombozytopenie in *Trpm7<sup>fl/fl-Pf4Cre</sup>* Mäusen und p.C721G Patienten verantwortlich ist (Stritt *et al.*, 2016). Dennoch ist es uns gelungen, eine essentielle Rolle der TRPM7-Kinaseaktivität für die Blutplättchen-Funktion zu identifizieren (sh. 2.3.) (Gotru *et al.*, 2018).

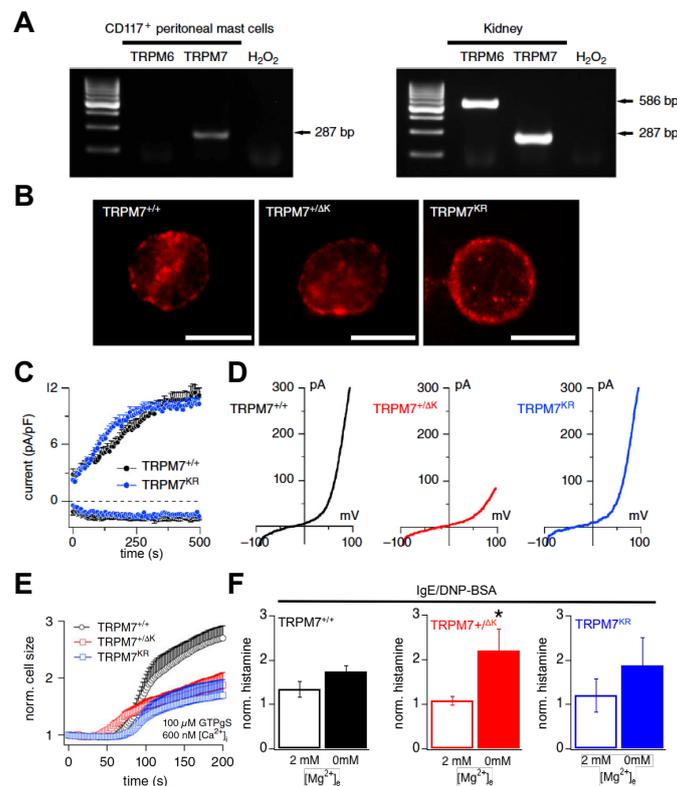
### 2.3. Funktion der TRPM7-Kinase bei allergischer Hypersensitivität und der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems

(Zierler *et al.*, 2016, Gotru *et al.*, 2018, Romagnani *et al.*, 2017)

Obwohl das  $Ca^{2+}$ - und  $Mg^{2+}$ -leitende Kanal-Enzym, TRPM7, in hämatopoetischen Zellen stark exprimiert ist, ist seine Rolle in diesen Zellen noch weitgehend unbekannt. Genetische Inaktivierung von TRPM7 in Mäusen resultiert in einem auffälligen Immunphänotyp, mit veränderter Thymopoese, Chemokin- und Zytokinexpression, sowie allergischer Hypersensitivität. Gemeinsam mit unseren Vorarbeiten, deuten diese Befunde darauf hin, dass die Aktivität von TRPM7-Kanal und -Kinase eine entscheidende Rolle bei Entzündungen spielen. Die Rolle des Kanals kann unter anderem durch dessen Einfluss auf die  $Mg^{2+}$ -Homöostase erklärt werden. Über die Funktion der TRPM7-Kinase bei Immunreaktionen weiß man allerdings noch sehr wenig. Um diese Frage zu beantworten, untersuchten wir den Phänotyp einer TRPM7-Kinase-defizienten Maus, mit einer Punktmutation an der aktiven Stelle der Kinase (K1646R) (*Trpm7<sup>R/R</sup>*), sowie entnommener Immunzellen in etablierten pro-entzündlichen Mausmodellen. *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäuse sind lebensfähig und zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp, oder allergische Hypersensitivität. Ihre systemischen  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen waren ähnlich zu WT-Tieren und die Kanal-Funktion war nicht beeinträchtigt durch die Punktmutation (Kaitsuka *et al.*, 2014; Romagnani *et al.*, 2017; Ryazanova *et al.*, 2014; Zierler *et al.*, 2016). Diese Mäuse ermöglichten uns daher unabhängige Untersuchungen der TRPM7-Kanal versus -Kinase-Einheiten.

Da *Trpm7<sup>+ΔK</sup>* Mäuse eine verstärkte Prädisposition für allergische Kontakt-Hypersensitivität entwickeln (Rayzanova *et al.*, 2010; sh. 2.2), *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäuse aber nicht, haben wir die Rolle der TRPM7-Kinase bei der Exozytose von Histamin aus Mastzellen, einem wichtigen Mediator von allergischen Reaktionen, weiter untersucht (Abb. 10). Mit Hilfe dieser beiden Mausmodelle konnten wir die TRPM7-Kinase als essentiellen Bestandteil der regulierten G-Protein-induzierten Exozytose identifizieren

(Zierler *et al.*, 2016). Die TRPM7-Kanalaktivität scheint hierbei eine untergeordnete Rolle zu spielen. Extrazelluläres  $Mg^{2+}$  hat einen stabilisierenden Effekt auf die  $Ca^{2+}$ -induzierte Mastzell-Exozytose, unabhängig von TRPM7 (Abb. 10E, F), und stellt einen zellulären Zusammenhang zwischen  $Mg^{2+}$ -Status und systemischen allergischen Reaktionen dar (Malpuech-Brugere *et al.*, 2000). Eine funktionierende TRPM7-Kinase stellt die korrekte  $Ca^{2+}$ -induzierte Exozytose sicher und reguliert die  $[Ca^{2+}]_i$ - und  $[Mg^{2+}]_e$ -Sensitivität der G-Protein abhängigen Mastzell-Exozytose. TRPM7-Inhibition mit NS593 brachte einen weiteren Hinweis, dass die Degranulation und Histamin-Ausschüttung von Mastzellen unabhängig von der Kanal-Funktion fungiert (Zierler *et al.*, 2016). Welche TRPM7-Substrate *in vivo* die Exozytose in Mastzellen regulieren, ist noch unbekannt und Teil unserer gegenwärtigen Untersuchungen.



**Abbildung 10: TRPM7-Kinase reguliert Exozytose und Histamin-Ausschüttung in Mastzellen. (A)** RT-PCR Analyse von TRPM6 und TRPM7 von FACS-sortierten CD117<sup>+</sup> peritonealen Mastzell- (links), sowie von Nieren-Lysaten (rechts). Eine 100 kb Leiter wurde als Marker verwendet. Anders als in den Nieren-Lysat-Kontrollen lässt sich eine TRPM6-Expression in murinen peritonealen Mastzellen nicht nachweisen. **(B)** TRPM7-Färbung von *Trpm7*<sup>+/+</sup>, *Trpm7*<sup>+/ΔK</sup> und *Trpm7*<sup>K1646R</sup> (*Trpm7*<sup>KR</sup>) Mastzellen. Balken zeigt 5 μm. Das TRPM7-Expressions-Muster ist in allen drei Maus-Phänotypen ähnlich. **(C)** Ganz-Zell-Ströme gemessen bei -80 mV und +80 mV über die Zeit (s) in Mastzellen isoliert von *Trpm7*<sup>+/+</sup> (schwarz, n = 8) und *Trpm7*<sup>KR</sup> (blau, n = 6) Mäusen. Dass TRPM7-Ströme in *Trpm7*<sup>+/ΔK</sup> Mastzellen stark reduziert sind, wurde in Ryazanova *et al.* 2010 bereits gezeigt. **(D)** Repräsentative Strom-Spannungs-Verhältnisse (I/V) von Mastzellen aus *Trpm7*<sup>+/+</sup> (schwarz), *Trpm7*<sup>+/ΔK</sup> (rot) und *Trpm7*<sup>K1646R</sup> (blau) Mutanten extrahiert bei 400 s. **(E)** Kapazitätsmessungen von 100 μM GTPγ-S-induzierter Exozytose in Gegenwart von 600 nM  $[Ca^{2+}]_i$  von *Trpm7*<sup>+/+</sup> (schwarz, n = 5), *Trpm7*<sup>+/ΔK</sup> (rot, n = 5) und *Trpm7*<sup>KR</sup> (blau, n = 6) Mastzellen. Daten wurden auf die initiale Kapazität als Maß für die Zellgröße normiert und als Mittelwerte ± S.E.M. über die Zeit (s) dargestellt. **(F)** Histamin-Messungen in IgE- und DNP-BSA-stimulierten Mastzellen mit (offene -) und ohne (gefüllte Balken) extrazellulärem  $Mg^{2+}$ . Daten zeigen Mittelwerte ± S.E.M. der auf die unstimulierten Kontrollzellen normierten *Trpm7*<sup>+/+</sup> (schwarz), *Trpm7*<sup>+/ΔK</sup> (rot) und *Trpm7*<sup>KR</sup> (blau) Mastzellüberständen gesammelt über 30 min aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die IgE-induzierte Histamin-Sekretion aus *Trpm7*<sup>+/ΔK</sup> und *Trpm7*<sup>KR</sup> Mastzellen in Gegenwart von  $[Mg^{2+}]_e$  war reduziert, in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  jedoch stark erhöht, verglichen mit *Trpm7*<sup>+/+</sup> Mastzellen. Modifiziert nach Zierler *et al.*, 2016.

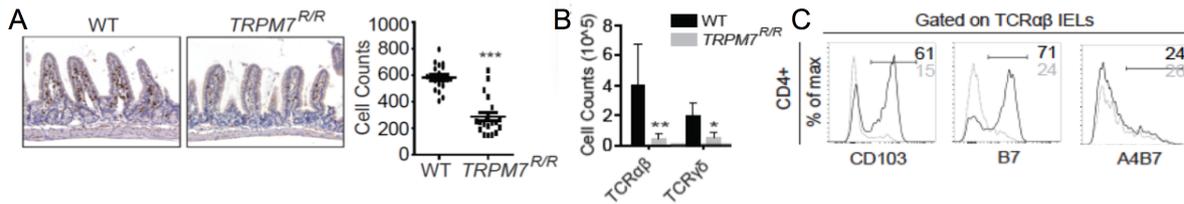
Unsere Befunde zeigen daher, dass die TRPM7-Kinaseaktivität die murine Mastzell-

Degranulation reguliert, indem sie deren Sensitivität für extrazelluläres  $Mg^{2+}$  verändert. Dies lässt vermuten, dass TRPM7 seine Entzündungs-modulierende Wirkung über seine Kinase-Domäne ausübt. Man weiß jedoch noch sehr wenig über die Aktivierungsmechanismen oder physiologische Substrate der Kanal-Kinasen.

Es wird angenommen, dass die TRPM7-Kinase Myosin-IIB-Filament-Stabilität und Actomyosin-Kontraktilität reguliert, indem sie Myosin-IIA-C phosphoryliert (Clark *et al.*, 2008). Kürzlich konnten wir in Kollaboration mit Dr. Attila Braun und Prof. Dr. Bernd Nieswandt zeigen, dass die TRPM7-Kanalaktivität auch Myosin-IIA-Aktivität, unabhängig von der Kinase-Funktion, reguliert (sh. 2.2.). In homozygoten *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäusen ist die Blutplättchen-Zahl, -Größe und -Morphologie zwar unverändert, dennoch kontrolliert die Kinaseaktivität die Plättchen-Funktion in arterieller Thrombose. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die TRPM7-Kinase Plättchen-Funktion über die Regulation der  $Ca^{2+}$ -Signale, PLC- $\beta$ , Syk- und PLC- $\gamma$ 2-Aktivität moduliert. Knochenmarks (BM) -Chimären lassen vermuten, dass die Kinase nicht nur für die Plättchen-Funktion essentiell ist, da beide, *Trpm7<sup>R/R</sup>*-Empfänger von WT-BM als auch WT-Empfänger von *Trpm7<sup>R/R</sup>*-BM eine Reduktion der Infarktgröße und Verbesserungen der neurologischen und motorischen Funktion in einem *in vivo* Modell der sog. „*transient middle cerebral artery occlusion*“ (tMCAO) aufwiesen.

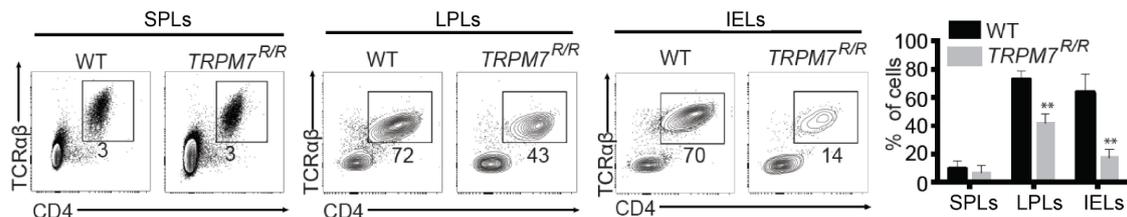
Um den tatsächlichen Beitrag der Plättchen zum Schutz der WT/BM<sup>*Trpm7<sup>R/R</sup>*</sup> Mäuse vor tMCAO-induzierten neurologischen Schäden zu ermitteln, wurden WT oder *Trpm7<sup>R/R</sup>* Plättchen auf WT-Mäuse ohne Thrombozyten übertragen. Zusammenfassend, konnten wir in Kollaboration mit Dr. Attila Braun und Prof. Bernd Nieswandt zeigen, dass das Ausschalten der TRPM7-Kinaseaktivität entweder in Plättchen oder in Neuronen ausreichend ist, um das Gehirn vor Entzündungs- oder Reperfusionsschäden zu schützen (Gotru *et al.*, 2018). Welche Rolle den T-Zellen bei dem Schutz vor neuronalen Schäden im tMCAO-Modell zukommt, ist jedoch noch ungeklärt und Gegenstand weiterer Untersuchungen. Betrachtet man die Tatsache, dass selektive Inhibition der TRPM7-Kinase-Funktion keine intrakraniellen Blutungen im ischämischen Gehirn auslöst und in Mäusen die Hämostase kaum beeinflusst, wird das Potential deutlich, dass die TRPM7-Kinase als therapeutische Zielstruktur für die Entwicklung von ‚sicheren‘ anti-thrombotische und entzündungshemmende Medikamente birgt (Gotru *et al.*, 2018).

Es wurde gezeigt, dass Gewebs-spezifischer Knock-out von *Trpm7* in T-Zellen die Thymopoese beeinträchtigt und veränderte Chemokin- und Zytokin-Expressionsmuster mit sich bringt (Jin *et al.*, 2008). Dies lässt vermuten, dass TRPM7-Kanal und/oder -Kinase für die T-Zellfunktion wichtig sind. Mit Hilfe des Kinase-defizienten *Trpm7<sup>R/R</sup>*-Mausmodells, konnten wir zeigen, dass die TRPM7-Kinaseaktivität nicht für die Thymopoese essentiell ist. Bemerkenswerterweise fanden wir aber, dass die Kinaseaktivität für die intra-epitheliale T-Zell-Homöostase maßgeblich ist. In Kinase-defizienten Mäusen fehlen Darm-spezifische intra-epitheliale T-Zellen aufgrund eines Defektes in der CD103-Expression (Abb. 11).



**Abbildung 11: Reduzierte intra-epitheliale Lymphozyten (IELs) in *TRPM7<sup>R/R</sup>*-Mäusen aufgrund reduzierter CD103-Expression. (A)** Immun-Histochemische Färbung von Dünndarm-Schnitten mit Hilfe CD3-spezifischer primär und biotinylierter sekundär Antikörper, gefolgt von Avidin-Biotin-Peroxidase-Markierung für die Darstellung der CD3-Expression (braune Punkte) in WT- oder *Trpm7<sup>R/R</sup>*-Mäusen (links) und relative Quantifizierung der CD3 positiven Zellen (rechts). **(B)** Statistische Analyse von IELs aus WT oder *Trpm7<sup>R/R</sup>*-Mäusen gefärbt mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern spezifisch für die TCR-Isoformen  $\alpha\beta$  oder  $\gamma\delta$  visualisiert mit Hilfe der Durchfluss-Zytometrie (FACS). Balkendiagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. **(C)** Repräsentative Histogramm-Überlagerungen der Oberflächen-Färbung (wie in (B)) mittel von CD103,  $\beta_7$  und  $\alpha_4\beta_7$  von CD4<sup>+</sup> IELs aus *Trpm7<sup>R/R</sup>* (grau) und WT (schwarz) Mäusen. \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001. Modifiziert nach Romagnani *et al.*, 2017.

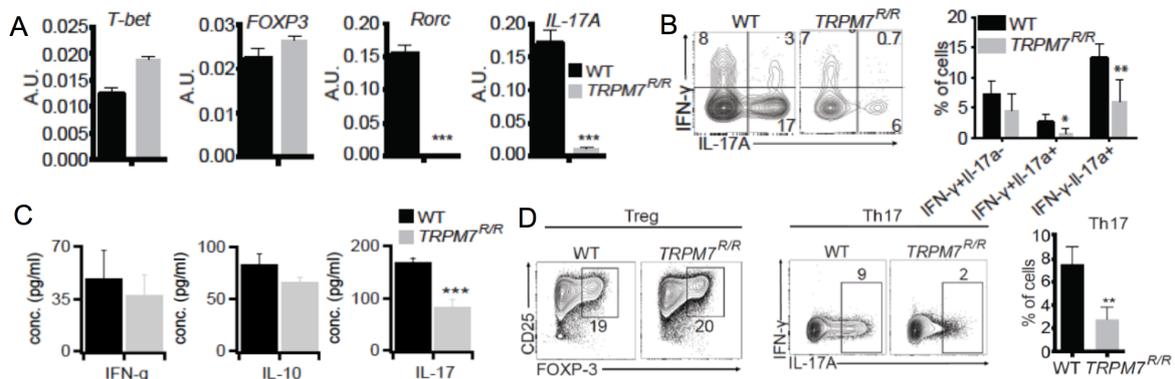
Um zu testen, ob der Defekt von *Trpm7<sup>R/R</sup>* T-Zellen CD103 zu exprimieren und ihre Fähigkeit das Darmepithel zu bevölkern, T-Zell intrinsisch ist, haben wir in Kooperation mit Prof. Dr. Fabio Grassi (IRB, Bellinzona) entweder WT oder *Trpm7<sup>R/R</sup>* naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in RAG<sup>-/-</sup>/ $\gamma$ -chain<sup>-/-</sup> Doppel-knock-out Mäuse, ohne T-, B- oder NK-Zellen, transferiert (Abb. 12). Während beide WT und *Trpm7<sup>R/R</sup>* naive T-Zellen die Milz gleich gut re-konstituierten, zeigten *Trpm7<sup>R/R</sup>* T-Zellen einen autonomen Defekt in der Kolonisation des Darmepithels und *Trpm7<sup>R/R</sup>* CD4<sup>+</sup> IELs exprimierten kaum CD103 (Romagnani *et al.*, 2017).



**Abbildung 12: *Trpm7<sup>R/R</sup>* T-Zell intrinsischer Defekt in der CD103-Expression und intra-epithelialer Lokalisation *in vivo*.** Dot-Plots und Statistische Analyse von Milz (spleen, SPLs), Lamina Propria (LPLs) und intra-epithelialer (IELs) TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten von RAG<sup>-/-</sup>/ $\gamma$ -chain<sup>-/-</sup> Mäusen re-konstituiert mit WT oder *Trpm7<sup>R/R</sup>* naiven T-Zellen. Prozentuale Zellzahlen sind in jedem Raster dargestellt, Balkendiagramme zeigen die gemittelten Prozentzahlen  $\pm$  S.E.M. (n = 4). \*\* P < 0.01. Modifiziert nach Romagnani *et al.*, 2017.

Die CD103-Expression wird durch TGF- $\beta$ -Stimulation hochreguliert, was einen möglichen Defekt im TGF- $\beta$ -Signalweg in *Trpm7<sup>R/R</sup>* T-Zellen vermuten lässt. Auch die Polarisation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in T<sub>H</sub>17 und in regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) wird durch TGF- $\beta$  ausgelöst. Wir konnten zeigen, dass die TRPM7-Kinaseaktivität für TGF- $\beta$ -abhängige CD103-Expression, sowie für T<sub>H</sub>17 Zell-Differenzierung, aber nicht für T<sub>reg</sub> Zell-Differenzierung notwendig ist (Abb. 13). *Trpm7<sup>R/R</sup>* IEL zeigten eine ausgeprägte Reduktion in *Rorc*, der Schlüssel-Transkriptionsfaktor und IL-17, das Zytokin von T<sub>H</sub>17 Zellen, während *T-bet* und *FoxP3*, als spezifische Transkriptionsfaktoren für T<sub>H</sub>1 und T<sub>reg</sub> Zellen, in *Trpm7<sup>R/R</sup>* IEL unverändert waren, verglichen mit WT (Abb. 13A). Durch intrazelluläre Färbung von IFN- $\gamma$  und IL-17A in *ex vivo* stimulierten IEL isoliert von WT und *TRPM7<sup>R/R</sup>* Mäusen konnten wir diese Befunde bestätigen. Während die Prozentzahl IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen vergleichbar war, war die Zahl IL-17A-sezernierender Zellen signifikant reduziert in *Trpm7<sup>R/R</sup>* verglichen mit WT-IEL (Abb. 13B). Diese Befunde waren konsistent mit der robusten Reduktion der IL-17-

Konzentration im Serum von *Trpm7<sup>R/R</sup>*-Mäusen (Abb. 13C). Auch die *in vitro* Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> *Trpm7<sup>R/R</sup>* T-Zellen konnte dieses Phänomen reproduzieren (Abb. 13D).

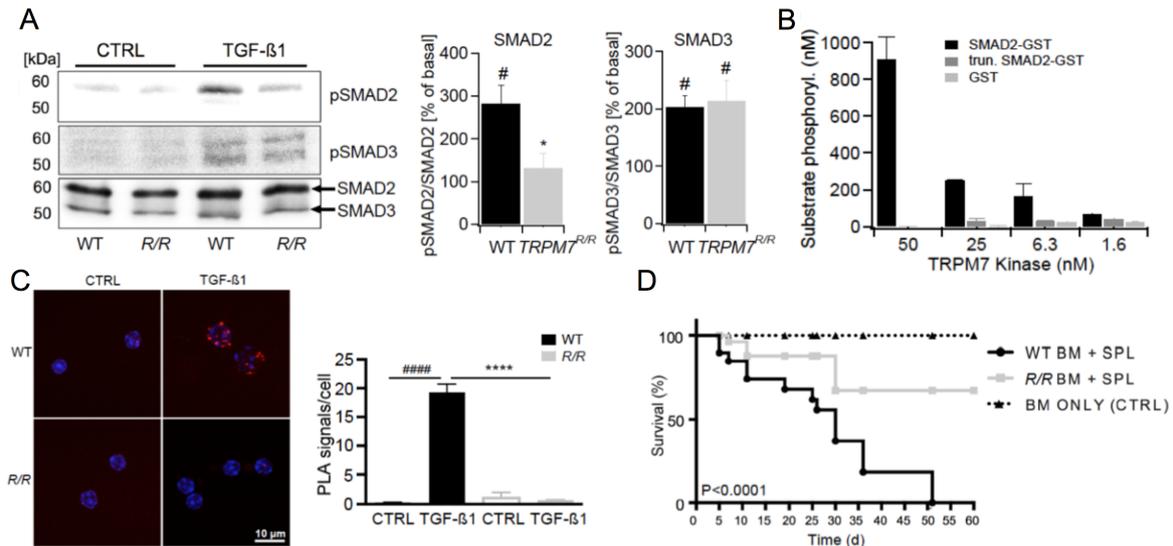


**Abbildung 13: TRPM7-Kinaseaktivität kontrolliert TGF- $\beta$ -induzierte T<sub>H</sub>17 Zell-Polarisation, ist aber entbehrlich für T<sub>reg</sub> Zell-Polarisation.** (A) Quantitative real-time PCR von *T-bet*, *FoxP3*, *Rorc* und *Il-17a* mRNA-Expression in TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> IEL von WT (schwarz) oder *Trpm7<sup>R/R</sup>* (grau) Mäusen. (B) Repräsentative Dot-Plots und statistische Auswertung von INF- $\gamma$  und IL-17A-Färbungen in WT (schwarz, n = 5) oder *Trpm7<sup>R/R</sup>* (grau, n = 8) TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> IEL. Prozentzahlen sind in jedem Raster dargestellt, Balkendiagramme zeigen mittlere Prozentzahlen  $\pm$  S.E.M. (C) Basale Zytokin-Konzentrationen gemessen im Serum von WT (schwarz, n = 3 - 7) und *Trpm7<sup>R/R</sup>* (grau, n = 3 - 7) Mäusen, dargestellt als pg/ml. Balkendiagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (D) Repräsentative Dot-Plots und statistische Auswertung von IFN- $\gamma$ , IL-17A, CD25 und FOXP3-Expression in stimulierten naiven T-Zellen unter T<sub>reg</sub> oder Th17-Differenzierungsbedingungen nach 5 Tagen. Prozentzahlen sind in jedem Raster dargestellt, Balkendiagramme zeigen mittlere Prozentzahlen  $\pm$  S.E.M. \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001. Modifiziert nach Romagnani *et al.*, 2017.

Da TGF- $\beta$  für die Hochregulation von CD103 über SMAD in humanen T-Zellen verantwortlich ist (Mokrani *et al.*, 2014) und TGF- $\beta$ /SMAD-Signalwege wichtig für die Polarisation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in T<sub>H</sub>17 Zellen ist (Veldhoen *et al.*, 2006), haben wir untersucht, ob die TGF- $\beta$ /SMAD-Signalwege durch die TRPM7-Kinaseaktivität beeinflusst werden. Interessanter Weise zeigten Western-Plot-Analysen von *Trpm7<sup>R/R</sup>* naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen, stimuliert mit TGF- $\beta$ 1, eine signifikante Reduktion der SMAD2 (Ser465/467) Phosphorylierung, während die SMAD3 (Ser423/425) Phosphorylierung unverändert blieb (Abb. 14A).

Mit Hilfe eines *in vitro* Kinase-Tests, mit rekombinanter TRPM7-Kinase und SMAD2-fusioniert mit Glutathione-S-Transferase (SMAD-GST), konnten wir die direkte Phosphorylierung bestätigen. Die TRPM7-Kinase phosphorylierte SMAD2 Dosis-abhängig, und war nicht in der Lage, die gekürzte SMAD2-Variante (trun. SMAD-GST) oder den GST-Tag (GST) alleine zu phosphorylieren. Wir konnten so ein erstes, natives TRPM7-Kinase-Substrat identifizieren: das C-terminale SXS-Motiv von SMAD2 (Abb. 14B).

Die direkte Phosphorylierung von SMAD2 durch die TRPM7-Kinase ist für dessen transkriptionelle Aktivität wichtig. Um die Interaktion der TRPM7-Kinase weiter zu charakterisieren, haben wir einen *Proximity Ligation Assay* (PLA) mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. Die Ko-Lokalisation von SMAD2 mit TRPM7 stieg in WT T-Zellen, im Gegensatz zu *Trpm7<sup>R/R</sup>* T-Zellen, nach TGF- $\beta$  Behandlung signifikant an (Abb. 14C).



**Abbildung 14: TRPM7-Kinase beeinflusst SMAD2-Aktivität über direkte Phosphorylierung und fördert die Besiedlung des Darms durch T-Zellen in akuten Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen.** (A) Repräsentative Western-Plot-Analyse und statistische Auswertung von SMAD2 (Ser465/467) und SMAD3 (Ser423/425) Phosphorylierung. Semi-quantitative Analyse wurde mit ImageJ durchgeführt und als Prozent-Intensitäts-Anstieg von pSMAD/total SMAD, verglichen mit Kontrollen, dargestellt. Balkendiagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4-5$ ). Eine einseitige Varianzanalyse demonstriert den signifikanten Anstieg in TGF- $\beta$ -induzierter SMAD-Phosphorylierung verglichen mit unbehandelten Kontrollen #  $P < 0.05$ . (B) Konzentrations-abhängige Phosphorylierung von humanem, rekombinatem SMAD2-GST durch die TRPM7-Kinase. Daten wurden mit Hilfe eines RBC-*hotspot in vitro* Kinase-Tests mit 4  $\mu$ M ATP und 4  $\mu$ M Substrat nach 2 h gewonnen. RBC-Standard-Substrat wurde als Positiv-, Substrat alleine als Negativ-Kontrolle verwendet; basale Kinaseaktivität wurde als Hintergrund abgezogen. Daten wurden zu nM Substrat-Phosphorylierung konvertiert und als Mittelwert  $\pm$  S.E.M. geplottet. (C) Analyse der Interaktion zwischen Smad2 und TRPM7 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Hilfe eines PLA-Tests. Während die SMAD2 Co-Lokalisation mit TRPM7 in WT T-Zellen, die mit 5 ng/ml TGF- $\beta$ 1 behandelt wurden, signifikant ansteigt, sind *Trpm7<sup>R/R</sup>* T-Zellen nicht in der Lage, als Reaktion auf TGF- $\beta$ 1-Stimulation, SMAD2 in die Nähe der TRPM7-Kinase zu rekrutieren. Balkendiagramme zeigen mittlere PLA-Signale pro Zelle, ausgewertet in 5 Gesichtsfeldern  $\pm$  S.E.M. (D) Überlebenskurve von letal bestrahlten BALB/c-Empfänger von B6 Knochenmarkszellen (BM) alleine (Kontrolle, CTRL, Dreiecke, gestrichelte Linie) oder in Kombination mit WT (schwarze Kreise) oder *Trpm7<sup>R/R</sup>* (*R/R*, graue Quadrate) Milzzellen ( $n = 10$ ). \*, #  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*, ###  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*, #####  $P < 0.0001$ . Modifiziert nach Romagnani *et al.*, 2017.

Darüberhinaus, konnten wir zeigen, dass die TRPM7-Kinaseaktivität die Kolonisation des Darms durch T-Zellen, in einer akuten Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (*graft-versus-host disease*, G<sub>v</sub>HD), reguliert (Abb. 14D). Während dieses Prozesses, erkennen naive Spender-T-Zellen Alloantigene auf Antigen-präsentierenden Zellen in Zielorganen, wie beispielsweise dem Dünndarm. Um festzustellen ob die gestörte Kolonisation des Dünndarms durch *Trpm7<sup>R/R</sup>* CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch akute G<sub>v</sub>HD beeinflussen könnte, haben wir in Kooperation mit Prof. Dr. Fabio Grassi das Knochenmark (BM) von BALB/c WT-Mäusen letal bestrahlt und durch BM-Zellen von WT C57BL/6 Mäusen zusammen mit WT oder *Trpm7<sup>R/R</sup>* Milz-Zellen ersetzt. Wie erwartet, führte die Injektion von WT Milz-Zellen zu massiven intestinalen Schäden und die meisten Tiere mussten innerhalb der ersten 35 Tage nach der Transplantation getötet werden. Im Gegensatz dazu führte die Injektion von *Trpm7<sup>R/R</sup>* Milz-Zellen zu keinen intestinalen Schäden sondern zu drastisch verbesserten Überlebensraten (Abb. 14D) (Romagnani *et al.*, 2017). Unsere Ergebnisse zeigen eine elementare Rolle der TRPM7-Kinase für die Funktion von T-Zellen auf und implizieren ein enormes therapeutisches Potential von Kinase-Inhibitoren um akute G<sub>v</sub>HD zu lindern.

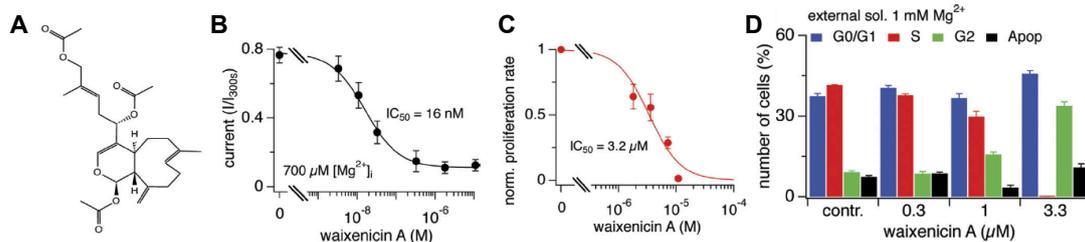
Insgesamt unterstreicht die Bedeutung von TRPM7 bei der Pathogenese von

entarteten Immunantworten und Thrombose, die Wichtigkeit neue pharmakologische Werkzeuge gegen TRPM7 zu identifizieren.

#### 2.4. TRPM7 als pharmakologische Zielstruktur

(Zierler *et al.*, 2011; Schafer *et al.*, 2016)

Bisher wurde die Expression und Aktivität von TRPM7 mit der Zellteilung verschiedenster Zelltypen, inklusive Lymphozyten und Krebszellen, in Verbindung gebracht. Außerdem spielt TRPM7 eine wichtige Rolle bei der Zellmigration indem das Kanal-Enzym Kalziumoszillationen ermöglicht. Leider waren bis lang keine spezifischen, pharmakologischen Modulatoren für TRPM7 verfügbar. Daher haben wir uns darauf konzentriert einen Blocker für TRPM7 zu finden. Wir haben dazu eine Bibliothek von biologischen Meeres-Extrakten untersucht und dabei einen relativ spezifischen Blocker, Waixenicin A, aus der Hawaiianischen Weichkoralle *Sarcothelia edmonsoni* identifiziert (Zierler *et al.*, 2011). Waixenicin A inhibiert TRPM7  $Mg^{2+}$ -abhängig und weist bei physiologischen  $[Mg^{2+}]_i$  einen  $IC_{50}$  von 16 nM auf (Abb. 15). Waixenicin A blockiert dosisabhängig die Zellteilung von Ratten- und humanen Leukämiezell-Linien und ist daher für eine mögliche Krebstherapie besonders interessant. In Kooperation mit Prof. Dr. Thomas Magauer (Universität Innsbruck) planen wir diesen Blocker durch chemische Veränderungen zu verbessern und dessen Analoge für eine mögliche Anwendung gegen Krebszellteilung, sowie Entzündungsreaktionen zu testen.



**Abbildung 15: Waixenicin A inhibiert TRPM7-Ströme und die Proliferation von Leukämiezellen. (A)** Chemische Struktur von Waixenicin A. **(B)** Dosis-Wirkungskurve von Waixenicin A auf TRPM7-Ströme. Ganz-Zell-Ströme von TRPM7 über-exprimierenden HEK293-Zellen wurden bei -80 mV bei 600 s extrahiert, normalisiert auf den Strom bei 300 s (vor der Applikation) und gegen die steigenden Waixenicin A Konzentrationen aufgetragen. (n = 5–13). **(C)** Normalisierte Proliferationsrate von RBL1-Zellen (rat basophilic leukemia) die für 2 Tage mit Waixenicin A behandelt wurden. Die Zellzahlen wurden mit Hilfe eines MTT-Tests analysiert (n = 3). Das Absorptions-Verhältnis von unbehandelten Kontrollen wurde als 100% der Proliferationsrate angenommen. **(D)** Waixenicin A induziert einen Wachstums-Arrest in humanen Jurkat Leukämiezellen. Jurkat T-Zellen wurden mit extrazellulärer Lösung ohne FBS inkubiert. Unterschiedliche Waixenicin A-Konzentrationen wurden für 2 h appliziert und die Zellen mit einem Antikörper gegen BrdU und 7-AAD gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (n = 3) Daten zeigen Mittelwerte ± S.E.M. Modifiziert nach Zierler *et al.*, 2011.

In Kooperation mit Dr. Vladimir Chubanov ist es uns außerdem gelungen einen positiven Modulator für TRPM7, Mibefradil, zu identifizieren. Die Aktivierung von TRPM7-Strömen durch Mibefradil ist relativ spezifisch, rasch, reversibel und reproduzierbar. Mibefradil stellt eine neue Klasse von TRPM7-Aktivatoren dar, die den Kanal nur unter physiologischen  $[Mg^{2+}]_i$  aktiviert (Schafer *et al.*, 2016). Dies macht auch diesen pharmakologischen Modulator besonders interessant, da mögliche physiologische Liganden von TRPM7 in ähnlicher Weise wirken könnten. Diese neuen pharmakologischen TRPM7-Modulatoren ermöglichen uns die physiologische Regulation von TRPM7 besser zu untersuchen.

### 3. Zusammenfassung und Ausblick

#### 3.1. Regulation des SOCE durch Kationenkanäle und deren Einfluss auf die Aktivierung und Proliferation hämatopoetischer Zellen

Eine Vielzahl an zellulären Reaktionen wie Teilung, Aktivierung und Zelltod werden durch Veränderungen der intrazellulären  $[Ca^{2+}]$  gesteuert. Besonders in Lymphozyten ist SOCE, vermittelt durch CRACM/Orai-Kanäle, geöffnet von STIM-Proteinen, und reguliert über  $K_v1.3$  und  $K_{Ca3.1}$ , essentiell für deren Funktion. Wir konnten einen Beitrag zur Aufklärung der Interaktion zwischen CRACM/Orai-Kanälen und STIM-Proteinen leisten (Lis & Zierler *et al.*, 2010). Außerdem haben wir  $K_{Ca3.1}$ , als potentielle Zielstrukturen, für die Behandlung von CLL, identifiziert (Grossinger *et al.*, 2014). Auch das Kanal-Enzym, TRPM7, ist wichtig für die Zellteilung von Lymphozyten, indem es die dafür nötige Energie, in Form von  $Mg^{2+}$ , bereit stellt (Sahni & Scharenberg, 2008; Zierler *et al.*, 2011). Wir konnten außerdem zeigen, dass TRPM7 intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Signale in Lymphozyten über seine Kinaseaktivität reguliert (Romagnani *et al.*, 2017). Interessanterweise, konnten wir aber in Kinase-defizienten Lymphozyten keine Defekte in der Proliferationsrate feststellen. Die  $Ca^{2+}$ -abhängige NFAT-Translokation, sowie die NFAT-abhängige Genexpression, scheint jedoch in ersten Versuchen verändert zu sein (Abb. 16A,B). Auch in Blutplättchen konnten wir zeigen, dass die TRPM7-Kinaseaktivität Rezeptor-vermittelten  $Ca^{2+}$ -Einstrom (ROCE) reguliert (Gotru *et al.*, 2018). Wir untersuchen derzeit in einer TRPM7-defizienten (KO) und einer Kinase-defizienten (KI) humanen Leukämiezell-Linie, HAP1, den Effekt von genetischer *Trpm7*-Deletion bzw. Kinase-Inaktivierung auf die zellulären  $Ca^{2+}$ -Signale, NFAT-Translokation und Proliferation. Außerdem haben wir interessante Befunde zur Rolle von TRPM7 in primären humanen Leukämie-Zellen gesammelt. Mit Hilfe pharmakologischer Modulation versuchen wir den Einfluss der TRPM7-Kanal bzw. Kinaseaktivität auf die Aktivierung und Proliferation humaner Leukämiezellen zu klären (Abb. 16C-E).

Diese Abbildung wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

**Abbildung 16: TRPM7 reguliert  $Ca^{2+}$ -abhängige Genexpression und die Aktivierung von Leukämiezellen.**

### 3.2. Funktion von Kationenkanälen bei allergischer Hypersensitivität

Neben  $\text{Ca}^{2+}$  gehört  $\text{Mg}^{2+}$  zu den wichtigsten Mineralien, das täglich durch unsere Nahrung dem Körper zugeführt werden muss. Wenn der Körper zu wenig  $\text{Mg}^{2+}$  aufnimmt, leidet er unter Hypomagnesiämie, was die zirkadiane Rhythmik, Gehirnfunktion, Herzfunktion, und die Funktion des Immunsystems beeinträchtigt. Wir konnten zeigen, dass die Aufnahme von  $\text{Mg}^{2+}$  auf einem Zusammenspiel von TRPM6 und TRPM7 im Darm beruht (Chubanov *et al.*, 2016). Allergische und Autoimmun-Erkrankungen gehen oft mit niedrigen systemischen  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen einher, bzw. werden durch Hypomagnesiämie noch verstärkt, was möglicherweise auf eine veränderte Funktion von TRPM7 zurückgeführt werden kann. Wir konnten zeigen, dass TRPM7 neben der zellulären auch für die systemische  $\text{Mg}^{2+}$ -Homöostase wichtig ist. Mäuse, bei denen die Enzym-Domäne von TRPM7 genetisch entfernt wurde, sind nicht lebensfähig (*Trpm7 $\Delta K/\Delta K$* ). Heterozygote Tiere (*Trpm7 $^{+/\Delta K}$* ) entwickeln Hypomagnesiämie. Interessanterweise, haben diese Tiere auch eine verstärkte Prädisposition für allergische Erkrankungen (Ryazanova *et al.*, 2010). Wir haben daher die Rolle von TRPM7-Kanal und -Kinase bei der Exozytose von Histamin aus Mastzellen, einem wichtigen Mediator von allergischen Reaktionen, weiter untersucht. Dafür haben wir ein zusätzliches Mausmodell verwendet, bei dem die TRPM7-Kinase mit Hilfe einer Punktmutation an der aktiven Stelle der Kinase inaktiviert worden ist (Ryazanova *et al.*, 2014). Mit Hilfe dieser beiden Mausmodelle, konnten wir die TRPM7-Kinase als essentiellen Bestandteil der regulierten G-Protein-induzierten Exozytose identifizieren. Die TRPM7-Kanalaktivität scheint hierbei eine untergeordnete Rolle zu spielen. Extrazelluläres  $\text{Mg}^{2+}$  hat einen stabilisierenden Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Mastzell-Exozytose, unabhängig von TRPM7, und stellt einen zellulären Zusammenhang zwischen  $\text{Mg}^{2+}$ -Status und systemischen allergischen Reaktionen dar (Zierler *et al.*, 2016). Welche TRPM7-Substrate *in vivo* die Exozytose in Mastzellen regulieren ist noch unbekannt und Teil unserer weiteren Untersuchungen.

Neben TRPM7 scheint auch ein Vertreter der *Two-Pore-Channel*-Familie, TPC1, für die Mastzell-Exozytose und Histamin-Sekretion wichtig zu sein. Es wird angenommen, dass TPCs eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale und vesikulärem Transport spielen. Die genauen Mechanismen dahinter sind aber noch wenig verstanden. Wir konnten zeigen, dass TPC1-defiziente Mäuse eine verstärkte Oxazolone-induzierte allergische Kontakt-Hypersensitivitäts-Reaktion ausbilden, verglichen mit WT-Geschwistern (Abb. 17). Unsere weiteren Ergebnisse zeigen, dass TPC1, als endo-lysosomaler Kationenkanal, lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase reguliert, indem er das Gleichgewicht zwischen Endo-Lysosomen und dem ER aufrecht erhält. Genetische oder pharmakologische Inhibition von TPC1 hat eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Überfüllung des ER zur Folge, was wiederum in erhöhter IgE-vermittelter Mastzell-Exozytose, Histamin-Sekretion und einer verstärkten allergischen Hypersensitivitäts-Reaktion *in vivo* resultiert. TPC-Kanäle stellen folglich eine vielversprechende Zielstruktur für die Behandlung von allergischen und Mastzell-abhängigen Erkrankungen dar. Das entsprechende Manuskript wurde bereits eingereicht (Arlt *et al.*, eingereicht).

Diese Abbildung wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Abbildung 17: TPC1-Aktivität reguliert die Funktion von Mastzellen und allergische Kontakt-Hypersensitivität.

### 3.3. Kationenkanäle regulieren die Homöostase des Immunsystems

Wir konnten zeigen, dass die TRPM7-Kinase Aktivität die Homöostase des Immunsystems reguliert. Kinase-defiziente Mäuse zeigen eine veränderte Zytokinexpression, sowie fehlende IELs im Darm. Dadurch sind diese Mäuse vor der Entwicklung einer akuten Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (G<sub>V</sub>HD) geschützt. Außerdem ist die Differenzierung von pro-entzündlichen Th17 T-Zellen stark reduziert, wohingegen sich regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>s) normal entwickeln. *In vitro* gelang es uns die molekularen Mechanismen dahinter zu entschlüsseln und SMAD2 als neues TRPM7-Kinase-Substrat zu identifizieren (Abb. 18) (Romagnani *et al.*, 2017).

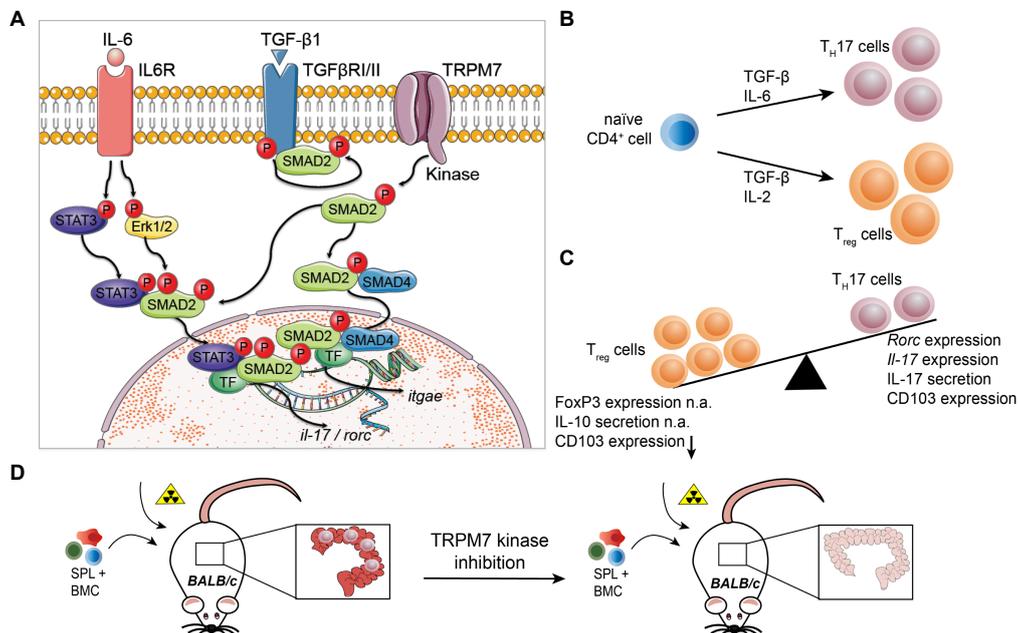
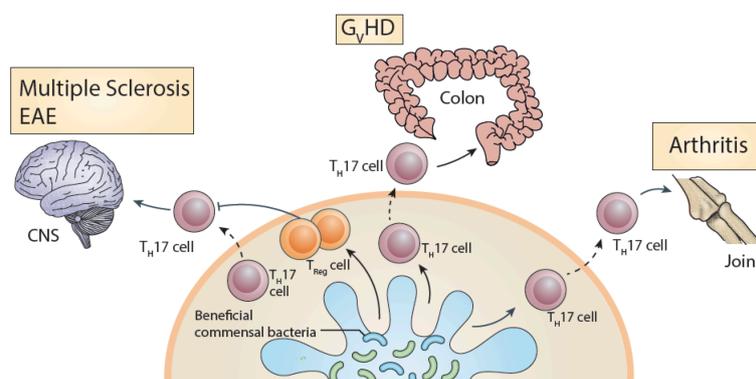


Abbildung 18: TRPM7-Kinase reguliert Immunsystem-Homöostase und G<sub>V</sub>HD. **(A)** Molekularer Mechanismus der TRPM7-Kinase vermittelten SMAD2-abhängigen Genexpression. TGF-β-Rezeptor-Stimulation (TGF-βRI/II) führt zur Rekrutierung von SMAD2 an die Plasmamembran. Hier wird SMAD2 in T-Zellen durch die TRPM7-Kinase phosphoryliert, was dessen Translokation in den Kern ermöglicht und zur Transkription von *itgae* (CD103), *il-17* und *rorc* führt. **(B, C)** Die Differenzierung von pro-entzündlichen T<sub>H</sub>17 und anti-entzündlichen regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) werden beide von TGF-β gesteuert. Während für die T<sub>H</sub>17-Differenzierung die N-terminale Phosphorylierung von SMAD2 aber essentiell ist, scheint sie für die Entwicklung der T<sub>reg</sub> Zellen entbehrlich zu sein. Blockade der TRPM7-Kinase führt daher zu einer selektiven Reduktion von T<sub>H</sub>17 Zellen, während die Zahl und Differenzierungsrate von T<sub>reg</sub> Zellen gleich

beleibt. **(D)** Pharmakologische Inhibition der TRPM7-Kinase könnte, daher und insbesondere aufgrund der zusätzlichen inhibitorischen Wirkung auf die CD103 Expression, die Entstehung von G<sub>V</sub>HD verhindern. CD103-negative Lymphozyten können nicht in Zielorgane, wie den Darm, einwandern, wo die Abstoßungsreaktion sich sonst manifestieren würde. Modifiziert nach Nadolni & Zierler, 2018.

Erste translationale Ergebnisse deuten darauf hin, dass TRPM7 auch wichtig für die Differenzierung von humanen T-Zellen, sowie die Proliferation von chronischen Leukämiezellen, ist. TRPM7-Kanal und -Kinase stellen daher mögliche Zielstrukturen für die Behandlung von pro-entzündlichen Erkrankungen, wie Multipler Sklerose und Arthritis (Abb. 19) sowie chronischen Leukämien dar. Durch pharmakologische Modulation von TRPM7 möchten wir zur Wiederherstellung der Homöostase des Immunsystems beitragen. Hierfür wollen wir neue TRPM7-Modulatoren identifizieren, sowie synthetische Waixenicin A Derivate testen.

Autoimmunerkrankungen fallen während einer Schwangerschaft oft deutlich milder aus. Aus immunologischer Sicht ist eine Schwangerschaft ein einzigartiger Zustand, in dem einerseits der Fötus vor dem maternalen Immunsystem geschützt werden muss, um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, andererseits aber Abwehrfunktionen aufrecht erhalten bleiben müssen. Der Prä-Implantations-Faktor (PIF), ist ein 15-Aminosäurelanges Peptid, das von lebenden Embryos bereits in sehr frühen Entwicklungsstadien produziert wird und während der gesamten Schwangerschaft nachgewiesen werden kann. Es wird angenommen, dass PIF immun-modulatorische Eigenschaften aufweist und die immunologische Toleranz gegenüber dem Embryo reguliert. Es wurde bereits gezeigt, dass PIF die Pathogenese vieler Autoimmunkrankheiten mildert. Der Mechanismus, wie PIF das Immunsystem reguliert, ist jedoch noch unbekannt. In Kooperation mit Prof. Dr. Markus Sperandio (LMU München) konnten wir K<sub>v</sub>1.3 als molekulare Zielstruktur für PIF identifizieren und eine Dosis-abhängige Inhibition der K<sub>v</sub>1.3-Ströme durch PIF in verschiedenen Zellmodellen zeigen. Das Manuskript ist derzeit in Fertigstellung.



**Abbildung 19: TRPM7-Kinase und K<sub>v</sub>1.3 als Zielstrukturen für ‚sichere‘ Behandlung gegen pro-entzündliche Erkrankungen.** Ein Ungleichgewicht von pro- und anti-entzündlichen Mechanismen ist meist die Grundlage für die Entwicklung und das Fortschreiten von Autoimmunkrankheiten und Abstoßungsreaktionen. Die TRPM7-Kinase ist für die Entwicklung von pro-entzündlichen T<sub>H</sub>17-Zellen essentiell, aber entbehrlich für die Entstehung der regulatorischen T-Zellen (T<sub>Reg</sub>). Eine spezifische Blockade der TRPM7-Kinase könnte somit die zelluläre Homöostase des Immunsystems wieder herstellen und die Pathogenese von Immun-Erkrankungen lindern. Ähnliches wurde schon für den K<sub>v</sub>1.3-Kanal gezeigt, der in Effektor-Gedächtniszellen besonders hoch exprimiert ist, welche bei der Pathogenese von Immun-Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Ein endogener K<sub>v</sub>1.3-Blocker ist daher von besonderem Interesse, da dieser eine relativ ‚sichere‘ Behandlung gegen Autoimmunkrankheiten und Abstoßungsreaktionen darstellt. Modifiziert nach Kamada *et al.* 2013.

#### 4. Literaturverzeichnis

Baba Y, Nishida K, Fujii Y, Hirano T, Hikida M, Kurosaki T Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nature Immunology* 9: 81-88, 2008

Bassi MT, Manzoni M, Monti E, Pizzo MT, Ballabio A, Borsani G Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucolipidin and identification of the two major founder mutations causing mucopolipidosis type IV. *Am J Hum Genet* 67: 1110-1120, 2000

Beesetty P, Wieczerek KB, Gibson JN, Kaitsuka T, Luu CT, Matsushita M, Kozak JA Inactivation of TRPM7 kinase in mice results in enlarged spleens, reduced T-cell proliferation and diminished store-operated calcium entry. *Scientific Reports* 8: 3023, 2018

Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, Kolski-Andreaco A, Wei E, Grino A, Counts DR, Wang PH, LeeHealey CJ, B SA, Sankaranarayanan A, Homerick D, Roeck WW, Tehranzadeh J, Stanhope KL, Zimin P, Havel PJ, Griffey S, Knaus HG, Nepom GT, Gutman GA, Calabresi PA, Chandy KG Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17414-17419, 2006

Berry CT, May MJ, Freedman BD STIM- and Orai-mediated calcium entry controls NF-kappaB activity and function in lymphocytes. *Cell calcium* 74: 131-143, 2018

Burger JA Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology American Society of Hematology Education Program* 2011: 96-103, 2011

Chubanov V, Ferioli S, Wisnowsky A, Simmons DG, Leitzinger C, Einer C, Jonas W, Shymkiv Y, Bartsch H, Braun A, Akdogan B, Mittermeier L, Sytik L, Torben F, Jurinovic V, van der Vorst EP, Weber C, Yildirim OA, Sotlar K, Schurmann A, Zierler S, Zischka H, Ryazanov AG, Gudermann T Epithelial magnesium transport by TRPM6 is essential for prenatal development and adult survival. *eLife* 52016

Chubanov V, Mederos y Schnitzler M, Waring J, Plank A, Gudermann T Emerging roles of TRPM6/TRPM7 channel kinase signal transduction complexes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371: 334-341, 2005

Chubanov V, Schlingmann KP, Waring J, Heinzinger J, Kaske S, Waldegger S, Mederos y Schnitzler M, Gudermann T Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia due to a missense mutation in the putative pore-forming region of TRPM6. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 7656-7667, 2007

Chubanov V, Waldegger S, Mederos y Schnitzler M, Vitzthum H, Sassen MC, Seyberth HW, Konrad M, Gudermann T Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2894-2899, 2004

Clark K, Middelbeek J, Dorovkov MV, Figdor CG, Ryazanov AG, Lasonder E, van Leeuwen FN The alpha-kinases TRPM6 and TRPM7, but not eEF-2 kinase, phosphorylate the assembly domain of myosin IIA, IIB and IIC. *FEBS Lett* 582: 2993-2997, 2008

Davis LC, Morgan AJ, Chen JL, Snead CM, Bloor-Young D, Shenderov E, Stanton-Humphreys MN, Conway SJ, Churchill GC, Parrington J, Cerundolo V, Galione A NAADP activates two-pore channels on T cell cytolytic granules to stimulate exocytosis and killing. *Current Biology : CB* 22: 2331-2337, 2012

de Baaij JH, Hoenderop JG, Bindels RJ Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiological Reviews* 95: 1-46, 2015

DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 307: 465-468, 1984

DeHaven WI, Jones BF, Petranka JG, Smyth JT, Tomita T, Bird GS, Putney JW, Jr. TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1. *The Journal of Physiology* 587: 2275-2298, 2009

Derler I, Jardin I, Romanin C Molecular mechanisms of STIM/Orai communication. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 310: C643-662, 2016

Dietrich A, Kalwa H, Gudermann T TRPC channels in vascular cell function. *Thrombosis and Haemostasis* 103: 262-270, 2010

Elamin A, Tuvemo T Magnesium and insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 10: 203-209, 1990

Fahrner M, Schindl R, Romanin C Studies of Structure-Function and Subunit Composition of Orai/STIM Channel. In *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*, Kozak JA, Putney JW, Jr. (eds), pp 25-50. Boca Raton (FL)2018

Faouzi M, Kilch T, Horgen FD, Fleig A, Penner R The TRPM7 channel kinase regulates store-operated calcium entry. *The Journal of Physiology* 595: 3165-3180, 2017

Feroli S, Zierler S, Zaisserer J, Schredelseker J, Gudermann T, Chubanov V TRPM6 and TRPM7 differentially contribute to the relief of heteromeric TRPM6/7 channels from inhibition by cytosolic Mg(2+) and Mg.ATP. *Scientific Reports* 7: 8806, 2017

Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441: 179-185, 2006

Feske S, Prakriya M, Rao A, Lewis RS A severe defect in CRAC Ca<sup>2+</sup> channel activation and altered K<sup>+</sup> channel gating in T cells from immunodeficient patients. *The Journal of Experimental Medicine* 202: 651-662, 2005

Feske S, Skolnik EY, Prakriya M Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nature Reviews Immunology* 12: 532-547, 2012

Fort P, Lifshitz F Magnesium status in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* 5: 69-78, 1986

Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* 275: 37137-37149, 2000

Gotru SK, Chen W, Kraft P, Becker IC, Wolf K, Stritt S, Zierler S, Hermanns HM, Rao D, Perraud AL, Schmitz C, Zahedi RP, Noy PJ, Tomlinson MG, Dandekar T, Matsushita M, Chubanov V, Gudermann T, Stoll G, Nieswandt B, Braun A TRPM7 Kinase Controls Calcium Responses in Arterial Thrombosis and Stroke in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38: 344-352, 2018

Grimm C, Chen CC, Wahl-Schott C, Biel M Two-Pore Channels: Catalyzers of Endolysosomal Transport and Function. *Frontiers in Pharmacology* 8: 45, 2017

Groschner K, Shrestha N, Fameli N Non-Orai Partners of STIM Proteins: Role in ER-PM Communication and Ca(2+) Signaling. In *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*, Kozak JA, Putney JW, Jr. (eds), pp 177-196. Boca Raton (FL)2018

Grossinger EM, Weiss L, Zierler S, Rebhandl S, Krenn PW, Hinterseer E, Schmolzer J, Asslaber D, Hainzl S, Neureiter D, Egle A, Pinon-Hofbauer J, Hartmann TN, Greil R, Kerschbaum HH Targeting proliferation of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells through KCa3.1 blockade. *Leukemia* 28: 954-958, 2014

Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Wymore RS, International Union of P International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacological Reviews* 55: 583-586, 2003

Huang GN, Zeng W, Kim JY, Yuan JP, Han L, Muallem S, Worley PF STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nature Cell Biology* 8: 1003-1010, 2006

Ji T, Corbalan-Garcia S, Hubbard SR Crystal structure of the C-terminal four-helix bundle of the potassium channel KCa3.1. *PLoS one* 13: e0199942, 2018

Jin J, Desai BN, Navarro B, Donovan A, Andrews NC, Clapham DE Deletion of Trpm7 disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg<sup>2+</sup> homeostasis. *Science* 322: 756-760, 2008

Kaitsuka T, Katagiri C, Beesetty P, Nakamura K, Hourani S, Tomizawa K, Kozak JA, Matsushita M Inactivation of TRPM7 kinase activity does not impair its channel function in mice. *Scientific Reports* 4: 5718, 2014

Kar P, Mirams GR, Christian HC, Parekh AB Control of NFAT Isoform Activation and NFAT-Dependent Gene Expression through Two Coincident and Spatially Segregated Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signals. *Molecular Cell* 64: 746-759, 2016

Kerschbaum HH, Cahalan MD Single-channel recording of a store-operated Ca<sup>2+</sup> channel in Jurkat T lymphocytes. *Science* 283: 836-839, 1999

Kerschbaum HH, Negulescu PA, Cahalan MD Ion channels, Ca<sup>2+</sup> signaling, and reporter gene expression in antigen-specific mouse T cells. *Journal of Immunology* 159: 1628-1638, 1997

Kilpatrick BS, Eden ER, Schapira AH, Futter CE, Patel S Direct mobilisation of lysosomal Ca<sup>2+</sup> triggers complex Ca<sup>2+</sup> signals. *Journal of Cell Science* 126: 60-66, 2013

Kozak JA, Kerschbaum HH, Cahalan MD Distinct properties of CRAC and MIC channels in RBL cells. *J Gen Physiol* 120: 221-235, 2002

Kuang Q, Purhonen P, Hebert H Structure of potassium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 72: 3677-3693, 2015

Lacruz RS, Feske S Diseases caused by mutations in ORA1 and STIM1. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2015

Launay P, Cheng H, Srivatsan S, Penner R, Fleig A, Kinet JP TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science* 306: 1374-1377, 2004

Li FY, Chaigne-Delalande B, Kanellopoulou C, Davis JC, Matthews HF, Douek DC, Cohen JI, Uzel G, Su HC, Lenardo MJ Second messenger role for Mg<sup>2+</sup> revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature* 475: 471-476, 2011

Li M, Jiang J, Yue L Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *The Journal of General Physiology* 127: 525-537, 2006

Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr., Meyer T STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Current Biology : CB* 15: 1235-1241, 2005

Lis A, Zierler S, Peinelt C, Fleig A, Penner R A single lysine in the N-terminal region of store-operated channels is critical for STIM1-mediated gating. *J Gen Physiol* 136: 673-686, 2010

Malpuech-Brugere C, Nowacki W, Daveau M, Gueux E, Linard C, Rock E, Lebreton J, Mazur A, Rayssiguier Y Inflammatory response following acute magnesium deficiency in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta* 1501: 91-98, 2000

Martin HE Clinical magnesium deficiency. *Ann N Y Acad Sci* 162: 891-900, 1969

Matsushita M, Kozak JA, Shimizu Y, McLachlin DT, Yamaguchi H, Wei FY, Tomizawa K, Matsui H, Chait BT, Cahalan MD, Nairn AC Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 20793-20803, 2005

Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, Murphy EJ, Koduru P, Ferrarini M, Zupo S, Cutrona G, Damle RN, Wasil T, Rai KR, Hellerstein MK, Chiorazzi N In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of Clinical Investigation* 115: 755-764, 2005

Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Deltas CC, Peters DJ, Somlo S PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272: 1339-1342, 1996

Mokrani M, Klibi J, Bluteau D, Bismuth G, Mami-Chouaib F Smad and NFAT pathways cooperate to induce CD103 expression in human CD8 T lymphocytes. *Journal of Immunology* 192: 2471-2479, 2014

Muik M, Fahrner M, Derler I, Schindl R, Bergsmann J, Frischauf I, Groschner K, Romanin C A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORA1 Channels. *J Biol Chem* 284: 8421-8426, 2009

Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM, Fleig A LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* 411: 590-595, 2001

Nadolni W, Zierler S The Channel-Kinase TRPM7 as Novel Regulator of Immune System Homeostasis. *Cells* 7 2018

Oda S, Uchida K, Wang X, Lee J, Shimada Y, Tominaga M, Kadowaki M TRPM2 contributes to antigen-stimulated Ca<sup>2</sup>(+)-influx in mucosal mast cells. *Pflugers Arch* 465: 1023-1030, 2013

Paravicini TM, Yogi A, Mazur A, Touyz RM Dysregulation of vascular TRPM7 and annexin-1 is associated with endothelial dysfunction in inherited hypomagnesemia. *Hypertension* 53: 423-429, 2009

Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington ED, Raunser S, Walz T, Garcia KC, Dolmetsch RE, Lewis RS STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* 136: 876-890, 2009

Reiser J, Polu KR, Moller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE, Pollak MR TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nature Genetics* 37: 739-744, 2005

Romagnani A, Vettore V, Rezzonico-Jost T, Hampe S, Rottoli E, Nadolni W, Perotti M, Meier MA, Hermanns C, Geiger S, Wennemuth G, Recordati C, Matsushita M, Muehlich S, Proietti M, Chubanov V, Gudermann T, Grassi F, Zierler S TRPM7 kinase activity is essential for T cell colonization and alloreactivity in the gut. *Nature Communications* 8: 1917, 2017

Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Liudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G, Stauderman KA STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *The Journal of Cell Biology* 169: 435-445, 2005

Ryazanova LV, Hu Z, Suzuki S, Chubanov V, Fleig A, Ryazanov AG Elucidating the role of the TRPM7 alpha-kinase: TRPM7 kinase inactivation leads to magnesium deprivation resistance phenotype in mice. *Scientific Reports* 4: 7599, 2014

Ryazanova LV, Rondon LJ, Zierler S, Hu Z, Galli J, Yamaguchi TP, Mazur A, Fleig A, Ryazanov AG TRPM7 is essential for Mg<sup>2+</sup> homeostasis in mammals. *Nature Communications* 1: 109, 2010

Sahni J, Scharenberg AM TRPM7 ion channels are required for sustained phosphoinositide 3-kinase signaling in lymphocytes. *Cell Metabolism* 8: 84-93, 2008

Schafer S, Ferioli S, Hofmann T, Zierler S, Gudermann T, Chubanov V Mibefradil represents a new class of benzimidazole TRPM7 channel agonists. *Pflugers Arch* 468: 623-634, 2016

Schmitz C, Dorovkov MV, Zhao X, Davenport BJ, Ryazanov AG, Perraud AL The channel kinases TRPM6 and TRPM7 are functionally nonredundant. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 37763-37771, 2005

Schmitz C, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, Kurosaki T, Fleig A, Scharenberg AM Regulation of vertebrate cellular Mg<sup>2+</sup> homeostasis by TRPM7. *Cell* 114: 191-200, 2003

Sforna L, Megaro A, Pessia M, Franciolini F, Catacuzzeno L Structure, Gating and Basic Functions of the Ca<sup>2+</sup>-activated K Channel of Intermediate Conductance. *Current Neuropharmacology* 16: 608-617, 2018

Stritt S, Nurden P, Favier R, Favier M, Ferioli S, Gotru SK, van Eeuwijk JM, Schulze H, Nurden AT, Lambert MP, Turro E, Burger-Stritt S, Matsushita M, Mittermeier L, Ballerini P, Zierler S, Laffan MA, Chubanov V, Gudermann T, Nieswandt B, Braun A Defects in TRPM7 channel function deregulate thrombopoiesis through altered cellular Mg<sup>2+</sup> homeostasis and cytoskeletal architecture. *Nature Communications* 7: 11097, 2016

Sun M, Goldin E, Stahl S, Falardeau JL, Kennedy JC, Acierno JS, Jr., Bove C, Kaneski CR, Nagle J, Bromley MC, Colman M, Schiffmann R, Slaugenhaupt SA Mucopolysaccharidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum Mol Genet* 9: 2471-2478, 2000

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24: 179-189, 2006

Venkatachalam K, Montell C TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76: 387-417, 2007

Vennekens R, Olausson J, Meissner M, Bloch W, Mathar I, Philipp SE, Schmitz F, Weissgerber P, Nilius B, Flockerzi V, Freichel M Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in

mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nature Immunology* 8: 312-320, 2007

Vig M, DeHaven WI, Bird GS, Billingsley JM, Wang H, Rao PE, Hutchings AB, Jouvin MH, Putney JW, Kinet JP Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels. *Nature Immunology* 9: 89-96, 2008

Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, Kinet JP CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science* 312: 1220-1223, 2006

Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop JG TRPM6 forms the Mg<sup>2+</sup> influx channel involved in intestinal and renal Mg<sup>2+</sup> absorption. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 19-25, 2004

Weber KS, Hildner K, Murphy KM, Allen PM Trpm4 differentially regulates Th1 and Th2 function by altering calcium signaling and NFAT localization. *Journal of Immunology* 185: 2836-2846, 2010

Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308: 1801-1804, 2005

Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, Chandy KG The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS. *The Journal of Clinical Investigation* 111: 1703-1713, 2003

Wulff H, Knaus HG, Pennington M, Chandy KG K<sup>+</sup> channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. *Journal of Immunology* 173: 776-786, 2004

Yasui M, Ota K Experimental and clinical studies on dysregulation of magnesium metabolism and the aetiopathogenesis of multiple sclerosis. *Magnes Res* 5: 295-302, 1992

Yasui M, Yase Y, Ando K, Adachi K, Mukoyama M, Ohsugi K Magnesium concentration in brains from multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 81: 197-200, 1990

Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O, Cahalan MD Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* 443: 226-229, 2006

Yuan JP, Zeng W, Dorwart MR, Choi YJ, Worley PF, Muallem S SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nature Cell Biology* 11: 337-343, 2009

Zeng W, Yuan JP, Kim MS, Choi YJ, Huang GN, Worley PF, Muallem S STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Molecular Cell* 32: 439-448, 2008

Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XH, Yu Y, Safrina O, Penna A, Roos J, Stauderman KA, Cahalan MD Genome-wide RNAi screen of Ca<sup>2+</sup> influx identifies genes that regulate Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9357-9362, 2006

Zhang Z, Yu H, Huang J, Faouzi M, Schmitz C, Penner R, Fleig A The TRPM6 kinase domain determines the Mg.ATP sensitivity of TRPM7/M6 heteromeric ion channels. *The Journal of Biological Chemistry* 289: 5217-5227, 2014

Zierler S, Hampe S, Nadolni W TRPM channels as potential therapeutic targets against pro-inflammatory diseases. *Cell Calcium* 67: 105-115, 2017

Zierler S, Sumoza-Toledo A, Suzuki S, Duill FO, Ryazanova LV, Penner R, Ryazanov AG, Fleig A TRPM7 kinase activity regulates murine mast cell degranulation. *The Journal of Physiology* 594: 2957-2970, 2016

Zierler S, Yao G, Zhang Z, Kuo WC, Porzgen P, Penner R, Horgen FD, Fleig A Waixenicin A inhibits cell proliferation through magnesium-dependent block of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 39328-39335, 2011

## 5. Danksagung

Zu aller Anfang möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Thomas Gudermann für seine kontinuierliche Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, sein Vertrauen bei der Etablierung meiner eigenen Arbeitsgruppe an seinem Institut, sowie für die Chance als Projektleiterin in unserem Sonderforschungsbereich mitzuwirken, bedanken. Seine Professionalität und seine Führungspersönlichkeit waren mir stets eine große Inspiration.

Ganz besonderes bedanke ich mich auch bei Prof. Dr. Hubert Kerschbaum (Universität Salzburg), der meine Faszination für die Wissenschaft schon früh geweckt hat. Seine Begeisterung und Freude an der Wissenschaft waren eine Motivationsquelle und haben meine Entscheidung, eine akademische Laufbahn einzuschlagen, wegweisend mit geprägt. Großer Dank gilt auch Prof. Dr. Reinhold Penner und Prof. Dr. Andrea Fleig (The Queen's Medical Center) für eine besonders lehrreiche und anspornende Postdoc-Zeit an der University of Hawai'i at Mānoa.

Den Mitgliedern des Fachmentorats, Prof. Dr. Martin Biel (Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU) und Prof. Dr. Hendrik Schulze-Koops (Medizinische Klinik und Polyklinik IV der LMU) möchte ich ebenfalls für die gute und zielstrebige Betreuung während meines Habilitationsverfahrens recht herzlich danken.

Für die tatkräftige Unterstützung und das voranbringen unserer Projekte danke ich meiner Arbeitsgruppe, insbesondere den naturwissenschaftlichen Doktoranden, Valentina Vettore, Sarah Hampe und Wiebke Nadolni, recht herzlich. Mein Dank gilt auch den medizinischen Doktoranden Dorothea Lewitz, Petro Bannout und Kilian Hölting und den Masterstudenten Maximiliane Kronberger, Stephanie Hunger, Jan Weber und Marco Fraticelli, die wichtige Beiträge in die laufenden Projekte eingebracht haben. Auch meinen assoziierten Doktoranden Elisabeth Arlt und Sylvia Ferioli danke ich recht herzlich für ihre engagierte Arbeit. Ich danke auch meiner technischen Assistentin Sheila Geiger für ihre Mitarbeit, sowie Frau Petra Eigner für die gute tierpflegerische Unterstützung. Für den jüngsten persönlichen und technischen Beistand möchte ich mich recht herzlich bei Lynda Addington bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Kollegen für die exzellente und erfolgreiche Zusammenarbeit. Stellvertretend seien Prof. Dr. Ingrid Boekhoff, Dr. Vladimir Chubanov, Dr. Andreas Breit, Dr. Susanne Mühlich und PD Dr. Harald Mückter genannt. Für die engagierte administrative Unterstützung möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Jutta Schreier, Thuc Huong Kuno, Josefine Lakatos und Monika Krämer bedanken. Mein Dank gilt außerdem meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Alexey Ryazanov (University New Jersey), Prof. Dr. David Horgen (Hawaii Pacific University), Prof. Dr. Fabio Grassi (IRB Bellinzona), Dr. Attila Braun (Universität Würzburg), Prof. Dr. Richard Greil (LIMCR, SALK, Salzburg) und Prof. Dr. Markus Sperandio (LMU München) für die gute Zusammenarbeit. Prof. Dr. Alexander Dietrich danke ich für seine inspirierende Einführung in die medizinische Lehre.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, der diese Arbeit gewidmet ist, einen ganz besonderen Dank aussprechen. Insbesondere meinem Partner Herbert und meinen beiden Kindern Richard und Elisabeth danke ich für ihren dauerhaften Beistand, der mir sehr viel Kraft gab, und ihr Verständnis für meine Faszination an der Wissenschaft.

## **6. Curriculum Vitae**

**Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.**

## 7. Verzeichnis eigener Publikationen

### A) Originalarbeiten

#### Erstauthorenschaften

Nr.	Autoren / Titel / Zeitschrift / Band / Seitenzahlen / Jahr	Impact-Faktor
1.	Zierler, S.*, Sumoza-Toledo, A., Suzuki, S., Ó Dúill F., Ryazanova, L. V., Penner, R., Ryazanov, A. G., Fleig, A*. TRPM7 kinase activity regulates murine mast cell degranulation. <i>The Journal of Physiology</i> 594, 2957-70, 2016 *corresponding author	5,1
2.	Zierler, S., Yao, G., Zhang, Z., Kuo, W. C., Porzgen, P., Penner, R., Horgen, F. D., Fleig, A. Waixenicin A inhibits cell proliferation through magnesium-dependent block of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> 286, 39328-39335, 2011	4,8
3.	Lis, A.*, Zierler, S.*, Peinelt, C., Fleig, A., and Penner, R. A single lysine in the N-terminal region of store-operated channels is critical for STIM1-mediated gating. <i>The Journal of General Physiology</i> 136, 673-686, 2010 *shared first author	4,3
4.	Zierler, S., Frei, E., Grissmer, S., and Kerschbaum, H. H. Chloride influx provokes lamellipodium formation in microglial cells. <i>Cellular Physiology and Biochemistry</i> 21, 55-62, 2008	3,2
5.	Zierler, S.*, Klein, B.*, Furtner, T., Bresgen, N., Lutz-Meindl, U., and Kerschbaum, H. H. Ultraviolet irradiation-induced apoptosis does not trigger nuclear fragmentation but translocation of chromatin from nucleus into cytoplasm in the microglial cell-line, BV-2. <i>Brain Research</i> 1121, 12-21, 2006 *shared first author	2,3
6.	Zierler, S., and Kerschbaum, H. H. Blockade of chloride conductance antagonizes PMA-induced ramification in the murine microglial cell line, BV-2. <i>Brain Research</i> 1039, 162-170, 2005	2,3

Kumulativer Impact-Faktor : 22,0

#### Letztauthorenschaft

Nr.	Autoren / Titel / Zeitschrift / Band / Seitenzahlen / Jahr	Impact-Faktor
1.	Romagnani A., Vettore V., Rezzonico-Jost T., Hampe S., Rottoli E., Nadolni W., Perotti M., Geiger S., Wennemuth G., Recordati C., Matsushita M., Proietti M., Chubanov V., Gudermann T., Grassi F.*, and Zierler S*. TRPM7 kinase activity is essential for T cell colonization and alloreactivity in the gut. <i>Nature Communications</i> 8:1917. doi: 10.1038/s41467-017-01960-z, 2017. *corresponding author	12,4

Kumulativer Impactfaktor: 12,4

#### Coauthorenschaften

Nr.	Autoren / Titel / Zeitschrift / Band / Seitenzahlen / Jahr	Impact-Faktor
1.	Gotru S.K., Chen W., Kraft P., Becker I.C., Wolf K., Stritt S., Zierler S., Hermanns H.M., Rao D., Perraud A.L., Schmitz C., Zahedi R., Noy P.J., Tomlinson M.G., Dandekar T., Matsushita M., Chubanov V., Gudermann T., Stoll G., Nieswandt B., Braun A. TRPM7 kinase controls calcium responses in arterial thrombosis and stroke in mice. <i>Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology</i> 38:344-352. doi:10.1161/ATVBAHA.117.310391, 2018	6,6
2.	Feroli S., Zierler S., Schredelseker J., Gudermann T., and Chubanov V. TRPM6 and TRPM7 differentially contribute to the relief of heteromeric TRPM6/7 channels from inhibition by cytosolic Mg <sup>2+</sup> and Mg-ATP. <i>Scientific Reports</i> 7, 8806, 2017	4,3
3.	Chubanov V., Feroli S., Wisnowsky A., Simmons D.G., Leitzinger C., Einer C., Jonas W., Shymkiv Y., Bartsch H., Braun A., Akdogan B., Mittermeier L., Sytk L., Torben F., Jurinovic V., van der Vorst E.P.C., Weber C., Yildirim O.A., Sotlar K., Schürmann A., Zierler S., Zischka H., Ryazanov A.G., Gudermann T. Epithelial magnesium transport by TRPM6 is essential for prenatal	7,7

- development and adult survival. *eLife* 5. pii: e20914. doi: 10.7554/eLife.20914, 2016
4. Stritt S., Nurden P., Favier R., Favier M., Ferioli S., Gotru SK., van Eeuwijk JM., Schulze H., Nurden AT., Lambert MP., Turro E., Burger-Stritt S., Matsushita M., Mittermeier L., Ballerini P., **Zierler S.**, Laffan MA., Chubanov V., Gudermann T., Nieswandt B., Braun A. Defects in TRPM7 channel function deregulate thrombopoiesis through altered cellular Mg<sup>2+</sup> homeostasis and cytoskeletal architecture. *Nature Communications* 29, 7:11097, 2016 12,1
  5. Schafer, S., Ferioli, S. Hofmann, T., **Zierler, S.**, Gudermann, T., Chubanov, V. Mibefradil represents a new class of benzimidazole TRPM7 channel agonists. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 468, 623-34, 2016 4,1
  6. Borth, H., Weber, N., Meyer, D., Wartenberg, A., Arlt, E., **Zierler, S.**, Breit, A., Wennemuth, G., Gudermann, T., and Boekhoff, I. The IP R Binding Protein Released with Inositol 1,4,5-Trisphosphate Is Expressed in Rodent Reproductive Tissue and Spermatozoa. *Journal of Cellular Physiology* 231, 1114-29, 2016 4,1
  7. Arndt, L., Castonguay, J., Arlt, E., Meyer, D., Hassan, S., Borth, H., **Zierler, S.**, Wennemuth, G., Breit, A., Biel, M., Wahl-Schott, C., Gudermann, T., Klugbauer, N., and Boekhoff, I. NAADP and the two-pore channel protein 1 participate in the acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Molecular Biology of the Cell* 25, 948-964, 2014 4,5
  8. Grossinger, E. M., Weiss, L., **Zierler, S.**, Rebhandl, S., Krenn, P. W., Hinterseer, E., Schmolzer, J., Asslaber, D., Hainzl, S., Neureiter, D., Egle, A., Pinon-Hofbauer, J., Hartmann, T. N., Greil, R., and Kerschbaum, H. H. (2014) Targeting proliferation of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells through KCa3.1 blockade. *Leukemia* 28, 954-958. 2013 10,4
  9. Solinski, H. J., **Zierler, S.**, Gudermann, T., and Breit, A. Human sensory neuron-specific Mas-related G protein-coupled receptors-X1 sensitize and directly activate transient receptor potential cation channel V1 via distinct signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 40956-40971, 2012 4,7
  10. Ryazanova, L. V., Rondon, L. J., **Zierler, S.**, Hu, Z., Galli, J., Yamaguchi, T.P., Mazur, A., Fleig, A., Ryazanov, A.G. TRPM7 is essential for Mg<sup>2+</sup> homeostasis in mammals. *Nature Communications* 1:109, 2010 11,5
  11. Sacha, B., **Zierler, S.**, Lehnardt, S., Weber, J. R., and Kerschbaum, H. H. (2008) Heterogeneous effects of distinct tocopherol analogues on NO release, cell volume, and cell death in microglial cells. *Journal of Neuroscience Research* 86, 3526-3535. 3,1
  12. Svoboda, N., **Zierler, S.**, and Kerschbaum, H. H. (2007) cAMP mediates ammonia-induced programmed cell death in the microglial cell line BV-2. *European Journal of Neuroscience* 25, 2285-2295. 3,4
  13. Furtner, T., **Zierler, S.**, and Kerschbaum, H. H. (2007) Blockade of chloride channels suppresses engulfment of microspheres in the microglial cell line, BV-2. *Brain Research* 1184, 1-9. 2,2
  14. Pottler, M., **Zierler, S.**, and Kerschbaum, H. H. (2006) An artificial three-dimensional matrix promotes ramification in the microglial cell-line, BV-2. *Neuroscience Letters* 410, 137-14 2,1

**Kumulativer Impact-Faktor :** 80,8

## B. Andere Publikationen - Eingeladene Review Artikel

- | Nr. | Autoren / Titel / Zeitschrift / Band / Seitenzahlen / Jahr   | Impact-Faktor |
|-----|--|---------------|
| 1.  | <b>Zierler S.*</b> , Hampe S., Nadolni W., TRPM channels as potential therapeutic targets against pro-inflammatory diseases. <i>Cell Calcium</i> 67, 105-115, 2017<br>*corresponding author    | 3,7           |
| 2.  | Nadolni W., <b>Zierler S.*</b> , The Channel-Kinase TRPM7 as Novel Regulator of Immune System Homeostasis. <i>Cells</i> 7(8). pii: E109. doi: 10.3390/cells7080109. 2018 *corresponding author | 4,8           |

**Kumulativer Impact-Faktor :** 8,5

**Gesamter Kumulativer Impact-Faktor :** 123,7

---

---

# Anhang

---

---

## Verzeichnis der Anhänge

### Originalarbeiten

A.1	A single lysine in the N-terminal region of store-operated channels is critical for STIM1-mediated gating	40
A.2	TRPM7 is essential for Mg <sup>2+</sup> homeostasis in mammals	57
A.3	Waixenicin A inhibits cell proliferation through magnesium-dependent block of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels	66
A.4	Targeting proliferation of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells through KCa3.1 blockade	75
A.5	Mibefradil represents a new class of benzimidazole TRPM7 channel agonists	98
A.6	TRPM7 kinase activity regulates murine mast cell degranulation	110
A.7	Defects in TRPM7 channel function deregulate thrombopoiesis through altered cellular Mg <sup>2+</sup> homeostasis and cytoskeletal architecture	124
A.8	Epithelial magnesium transport by TRPM6 is essential for prenatal development and adult survival	173
A.9	TRPM6 and TRPM7 differentially contribute to the relief of heteromeric TRPM6/7 channels from inhibition by cytosolic Mg <sup>2+</sup> and Mg·ATP	205
A.10	TRPM7 Kinase Controls Calcium Responses in Arterial Thrombosis and Stroke in Mice	240
A.11	TRPM7 kinase activity is essential for T cell colonization and alloreactivity in the gut	259

### Review Artikel

A.12	The Channel-Kinase TRPM7 as Novel Regulator of Immune System Homeostasis	280
A.13	TRPM channels as potential therapeutic targets against pro-inflammatory diseases	291

### Zur Begutachtung eingereichte Artikel

A.14	Augmented mast cell activity and contact hypersensitivity in mice lacking the two-pore channel TPC1	307
------	---	-----