

# **Funktionelle Kooperation der Transmembransegmente S3 und S4 beim Schaltverhalten von TRPM8**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur  
Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe Mathis Winking

aus Lübeck

Berichter: Privatdozent Dr. Frank Kühn

Universitätsprofessor Dr. Marc Spehr

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der  
Hochschulbibliothek online verfügbar.

Erstberichterstatter: PD. Dr. Frank. Kühn

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Marc Spehr

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, wurden unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Des Weiteren wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

---

Datum

---

Unterschrift

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>7</b>
2.1 Physiologische Bedeutung von Ionenkanälen .....	7
2.2 Die Familie der TRP-Kanäle.....	7
2.3 Der Kälte- und Menthol-Rezeptor TRPM8.....	10
2.3.1 Struktur von TRPM8.....	12
2.3.2 Schaltverhalten von TRPM8.....	13
2.4 TRPM2.....	15
2.4.1 Expression von TRPM2.....	15
2.4.2 Struktur von TRPM2.....	16
2.4.3 Schaltverhalten von TRPM2.....	17
2.5 Bekannte Struktur-Funktionsbeziehungen von TRPM8 .....	19
2.6 Bekannte Struktur-Funktionsbeziehungen von TRPM2 .....	21
2.7 Ziel der Arbeit .....	23
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
3.1 Material .....	24
3.1.1 Chemikalien.....	24
3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	26
3.1.3 Geräte .....	27
3.1.4 Software .....	28
3.1.5 Kits.....	28
3.1.6 Antikörper .....	29
3.1.7 Oligonukleotide.....	29
3.1.8 Enzyme .....	30
3.1.9 Standards .....	31
3.1.10 E. coli Bakterien, Zelllinien .....	31
3.1.11 Medien und Lösungen .....	31

---

3.1.11.1 Bakterielle Zellkultur: .....	31
3.1.11.2 Zellkultur: .....	32
3.1.11.3 Proteinbiochemische Arbeiten: .....	32
3.1.11.4 Elektrophysiologische Arbeiten: .....	33
3.2 Methoden .....	34
3.2.1 Zellkultur .....	34
3.2.1.1 Kultivierung von menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-293-Zellen) .	34
3.2.1.2 Transfektion von HEK-293-Zellen.....	35
3.2.1.3 Beschichtung der Deckgläser .....	35
3.2.2 Elektrophysiologie.....	36
3.2.2.1 Elektrophysiologische Messungen (Patch-Clamp-Technik) .....	36
3.2.2.2 Durchführung einer Patch-Clamp-Messung.....	36
3.2.2.3 Funktionsweise eines Patch-Clamp-Verstärkers.....	38
3.2.2.4 Versuchsaufbau der elektrophysiologischen Untersuchung von TRPM8/TRPM2 .....	38
3.2.2.5. Vorbereitung der Patch-Clamp-Messungen von TRPM8 und TRPM2 .....	39
3.2.2.6 Durchführung der Patch-Clamp-Messungen von TRPM8 (Menthol- und Kälte-sensitivität) .....	40
3.2.2.7 Durchführung der Patch-Clamp-Messungen von TRPM8 (Spannungssensitivität) .....	40
3.2.2.8 Durchführung der Patch-Clamp-Messungen von TRPM2.....	41
3.2.2.9 Patch-Pipetten.....	42
3.2.2.10 Spannungsrampe.....	42
3.2.2.11 Spannungsstufenprotokoll .....	43
3.3 Molekularbiologische Methoden .....	45
3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR).....	45
3.3.2 Überprüfung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese.....	46
3.3.3 DNA-Sequenzierung .....	47
3.3.4 Restriktionsverdau .....	47
3.3.5 Klonierung.....	47
3.3.6 Ligation.....	49
3.3.7 Transformation .....	50
3.3.8 Selektion und Kultivierung.....	50

3.3.9 Plasmid-Mini-Präparation (Mini-Prep) .....	50
3.3.10 Plasmid-Maxi-Präparation (Maxi-Prep) .....	51
3.3.11 PCR basierte in-vitro-Mutagenese .....	51
3.4 Proteinbiochemische Methoden .....	52
3.4.1 Zelloberflächenbiotinylierung .....	52
3.4.2 Zentrifugationsmethode .....	54
3.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford-Assay) .....	55
3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	55
3.4.5 Western-Blot .....	56
3.4.6 Immunodetektion von Proteinen .....	57
3.5 Datenanalyse und Statistik .....	58
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
4.1 Einfluss der Transmembrandomäne S3 auf das Schaltverhalten von TRPM8 und TRPM2 .....	59
4.1.1 Einfluss der äußeren Reste des Sensormoduls auf das Schaltverhalten von TRPM8 .....	61
4.1.1.1 Die äußeren Reste des Sensormoduls beeinflussen die Spannungsabhängigkeit von TRPM8 .....	61
4.1.1.2 Die äußeren Reste des Sensormoduls beeinflussen die Menthol- und Kältesensitivität von TRPM8 .....	64
4.1.1.3 Einfluss der äußeren Reste des Sensormoduls auf die Oberflächenexpression von TRPM8 .....	66
4.2 Einfluss der äußeren Reste des Sensormoduls auf das Schaltverhalten von TRPM2 ....	67
4.3 Einfluss der inneren Aminosäurereste des N-x-x-D- Sequenzmotivs auf das Schaltverhalten und die Oberflächenexpression von TRPM8 und TRPM2 .....	69
4.4 Interaktion zwischen den Transmembrandomänen S3 und S4 in TRPM8 .....	71
4.4.1 Funktionelle Auswirkung der Ladungsumkehrmutation R842D bzw. R842E .....	73
4.4.2 Analyse der S3/S4-Doppel-Ladungsmutante M8-D802R+R842D .....	75
4.4.3 Funktionelle Analyse der S3-Ladungsmutante M8-D802R .....	79
4.4.4 Gibt es für D802R einen elektrostatischen Interaktionspartner innerhalb der Transmembrandomäne S4? .....	82
4.4.5 Gibt es für die Mutante M8-R842D einen zu D802R alternativen elektrostatischen Interaktionspartner in der Transmembrandomäne S3? .....	84

4.4.6 Funktionelle Analyse der TRPM8-Mutanten D802N+R842D.....	87
4.5 Funktionelle Auswirkungen zusätzlicher, in das S4-Segment von TRPM8 eingebrachter positiver Ladungen .....	89
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>94</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>110</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis .....	110
7.2 Publikationen.....	113
Danksagung .....	114

## 1. Zusammenfassung

TRP-Kanäle sind polymodale Rezeptoren, die an vielen physiologischen Prozessen maßgeblich beteiligt sind. Bei TRPM8 handelt es sich um einen Kältesensor, der ebenfalls durch Substanzen, die ein Kältegefühl vermitteln, wie beispielsweise Menthol aktiviert wird. Darüber hinaus ist der TRPM8-Kanal spannungsabhängig, wobei die Spannungssensitivität sowohl durch Kälte als auch durch verschiedene TRPM8-Kanalagonisten positiv moduliert wird. Im Gegensatz zu den gut erforschten „klassischen“ spannungsabhängigen Kationenkanälen gibt es bisher für TRPM8 kein allgemein akzeptiertes Modell, welches im Detail den Gating-Mechanismus beschreibt. In Anlehnung an ein Computermodell zum Schaltverhalten von TRPM8 wurden in der vorliegenden Arbeit durch Einführung gezielter Mutationen in den Transmembrandomänen S3 und der für die Spannungssensitivität wichtigen S4 mögliche funktionelle Wechselwirkungen zwischen diesen Domänen systematisch analysiert. Zusätzlich erfolgte eine Analyse der strukturellen und funktionellen Bedeutung der S3 und S4 für das Schaltverhalten und die Faltung von TRPM8.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis einer funktionellen Kooperation zwischen den Transmembransegmenten S3 und S4 bei TRPM8 erbracht werden. Die Ladungsverteilung im zentralen Bereich dieser Proteindomänen spielt eine entscheidende Rolle für die korrekte Faltung bzw. für die posttranslationale Reifung (Glykosylierung) des Kanals und ist zusätzlich von funktioneller Bedeutung. Das innerhalb der S3 gelegene hochkonservierte Sequenzmotiv N-x-x-D ist darüber hinaus nicht nur für TRPM8 sondern auch für den Verwandten TRPM2-Kanal von funktioneller Relevanz. Des Weiteren konnten durch systematische Ladungsveränderungen im Transmembransegment S4 von TRPM8 neue Erkenntnisse im Bezug auf die Spannungsabhängigkeit von TRPM8 gewonnen werden, die das bislang favorisierte Modell eines autonomen mobilen S4-Spannungssensors bei TRPM8 in Frage stellen.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine, von S3 und S4 gemeinsam gebildete, Proteindomäne bei TRPM8 hin. Diese dient u.a. der Interaktion des Kanals mit verschiedenen TRPM8-Agonisten und ist darüber hinaus für die Spannungssensitivität des Kanals von entscheidender Bedeutung, möglicherweise durch eine Wechselwirkung mit dem negativ geladene Phospholipid PIP<sub>2</sub>.

## Summary

TRP channels are polymodal receptors that are involved in many substantial physiological processes. TRPM8 is a sensor for cold temperatures, but can additionally be activated by substances that mediate a cold feeling such as menthol. Furthermore, the TRPM8 channel is voltage-dependent, whereby the voltage sensitivity can be positively modulated both by cold as well as by various TRPM8 channel agonist. In contrast to the well studied "classical" voltage-dependent cation channels, there is no generally accepted model for TRPM8, which describes the gating mechanism in detail so far. Based on a recently published computer simulated model for TRPM8 gating, we used site directed mutagenesis to systematically analyze potential interactions between transmembrane domain S3 and S4, which has been demonstrated to be essential for voltage sensitivity. Furthermore, the structural and functional importance of S3 and S4 for gating and folding of TRPM8 was analyzed.

In the present work, the evidence of a functional cooperation between the transmembrane segment S3 and S4 in TRPM8 was proofed. The charge distribution in the central region of these protein domains plays a crucial role for a proper folding and for post-translational maturation (glycosylation) of the channel and therefor is essential for its functionality. Furthermore, the highly conserved sequence motif N-x-x-D located in S3, is not only for TRPM8 but also for the closely related TRPM2 channel of functional relevance. In addition, new insights could be gained about the voltage dependence of TRPM8 by systematic changes of charged amino acids within the S4 segment, which question the so far favored model of an autonomous mobile S4 voltage sensor in TRPM8.

Taken together, the results of this study indicate a protein domain corporately formed by S3 and S4 in TRPM8. This domain conduces i.a. the interaction of the channel with different TRPM8 agonists and additionally is of crucial importance for the voltage sensitivity of the channel, possibly through an interaction with the negatively charged phospholipid PIP<sub>2</sub>.

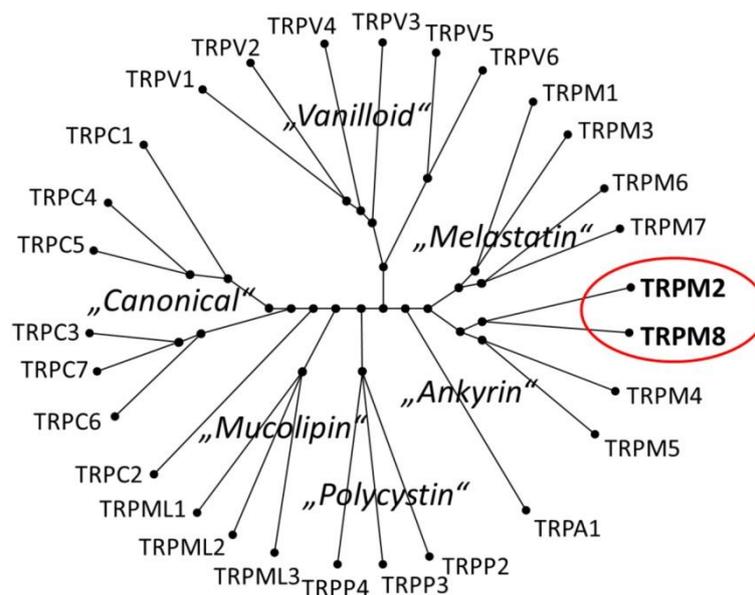
## 2. Einleitung

### 2.1 Physiologische Bedeutung von Ionenkanälen

Ionenkanäle sind an diversen zellulären Abläufen maßgeblich beteiligt und führen daher im Fall einer Fehlfunktion zu einer Vielzahl von schwerwiegenden Krankheiten, die unter dem Oberbegriff Kanalerkrankungen (engl.: Channelopathies) zusammengefasst werden. Zu diesen gehören u.a. Skelettmuskelerkrankungen (z.B. Myotonien), Erkrankungen des Nervensystems (z.B. generalisierte Epilepsie) und Herzmuskelerkrankungen (z.B. Long-QT-Syndrom) sowie verschiedene Stoffwechselerkrankungen, wie etwa Mukoviszidose (Lerche et al., 2000; Rowe et al., 2005). Für therapeutische Ansätze, wie z.B. die Entwicklung von Medikamenten, ist es daher essentiell, die Struktur-Funktionsbeziehungen von Ionenkanälen im Detail zu charakterisieren.

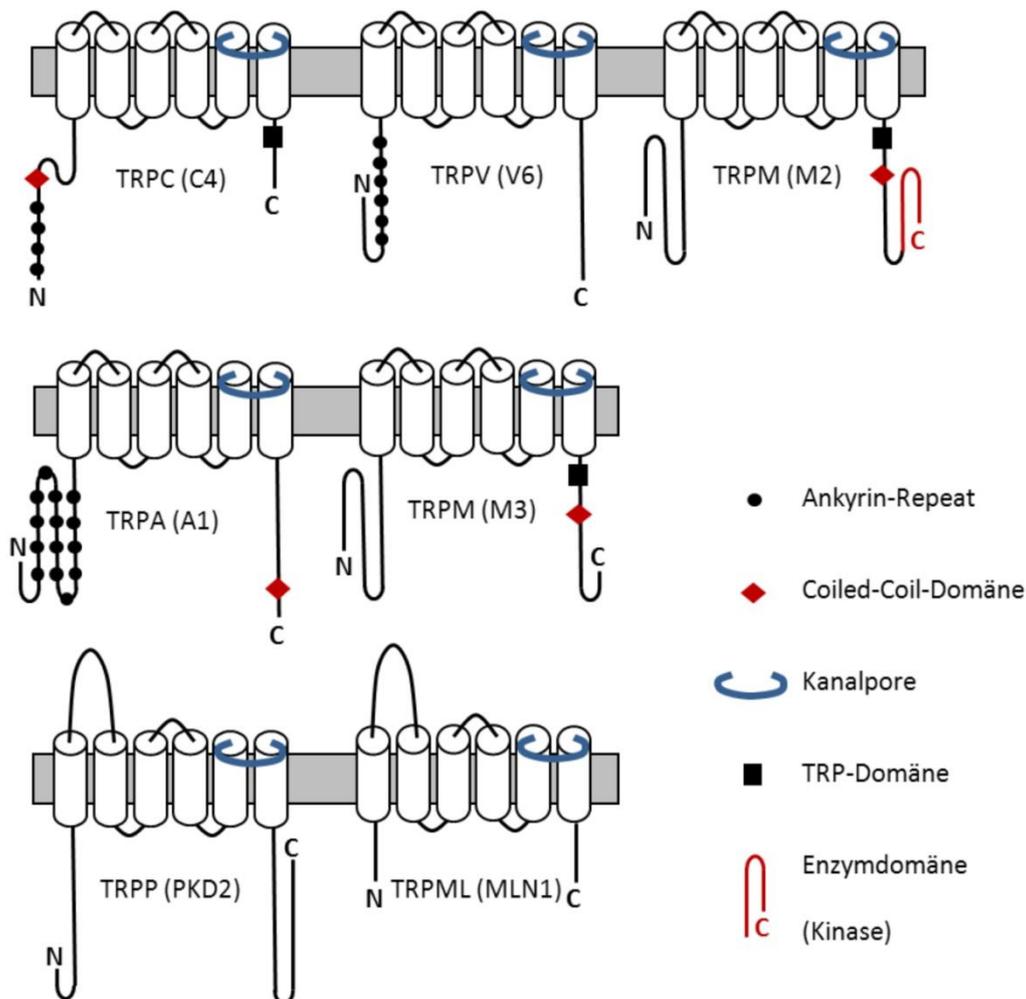
### 2.2 Die Familie der TRP-Kanäle

Die Familie der *transient receptor potential*-Kanäle (TRP-Kanäle) bildet innerhalb der Ionenkanal-Familie mit ca. 30 bisher entdeckten Mitgliedern eine große Gruppe, die sich weiter in zwei Gruppen und sieben Unterfamilien unterteilen lässt.



**Abb. 1:** Phylogenetischer Stammbaum der Säugetier-TRP-Kanäle, aufgeteilt in 6 Untergruppen mit insgesamt 28 Mitgliedern (vgl. Gees et al., 2010).

Die erste Gruppe umfasst dabei die TRPC- (*canonical*), TRPV- (*vanilloid*), TRPM- (*melastatin*), TRPA- (*ankyrin*) und die TRPN-Unterfamilien. Die zweite Gruppe die TRPP- (*polycystin*) sowie die TRPML-Unterfamilien (*mucoipin*). Bei allen TRP-Kanälen handelt es sich ausschließlich um Kationenkanäle, deren Selektivität für bestimmte Kationen jedoch meist nur schwach ausgebildet ist (Venkatachalam & Montell, 2007).



**Abb. 2:** Strukturelle Charakteristika der verschiedenen Säugetier-TRP-Unterfamilien. Einzelne Vertreter der jeweiligen Kanalfamilie sind in runden Klammern benannt. Die verschiedenen Proteindomänen sind in der Legende rechts angegeben. Bei den Ankyrin-Repeats handelt es sich um für Protein-Protein Wechselwirkungen wichtige Sequenzmodule. Die Coiled-Coil-Domänen der TRPs sind für die Tetramerisierung wichtig. Als Beispiel für TRPs mit einer Enzymdomäne, sogenannte *Chanzymses*, ist hier TRPM2 dargestellt. Die TRP-Domäne ist kurz hinter der Transmembrandomäne S6 am cytosolischen C-Terminus der meisten TRPs lokalisiert, besteht aus 26 Aminosäuren und beinhaltet die unter den meisten TRP-Kanälen hochkonservierte TRP-Box (WKFQR [Aminosäuresequenz im Einzelbuchstabencode]) (vgl. Flockerzi, 2007).

In Analogie zu den intensiv erforschten spannungsabhängigen Kaliumkanälen vom Typ „Shaker“ wird für die TRP-Kanäle ein homo- oder heterotetramerer Aufbau angenommen. Jede TRP-Untereinheit besteht aus sechs Transmembrandomänen S1-S6, einer putativen Porenregion zwischen S5 und S6 sowie einem intrazellulär gelegenen Amino- und Carboxy-Terminus (s. Abb.2) (Tsuruda et al., 2006; Lepage & Boulay, 2007).

Bezeichnend für die TRP-Familie ist eine große Variabilität in Bezug auf ihre Expression, ihre Beteiligung an wichtigen zellulären Prozessen sowie die Art der aktivierenden Stimuli. Auf diese Weise kann eine Aktivierung durch mechanische Reizung (TRPA1), durch Änderung der Temperatur (u.a. TRPM8, TRPV1) oder durch verschiedene chemische Agentien wie Capsaizin (TRPV1) oder Menthol (TRPM8) hervorgerufen werden (Clapham, 2003; Venkatachalam & Montell, 2007). In vielen Fällen ist dabei die Aktivierung ein und desselben Kanals durch verschiedene Stimuli möglich. Ein weiteres Charakteristikum vieler TRP-Kanäle ist ein, verschiedene Gewebetypen umfassendes Expressionsmuster. TRP-Kanäle konnten sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Membranen von erregbaren und nicht erregbaren Zellen unterschiedlichster Gewebetypen nachgewiesen werden (Ramsey et al. 2006; Nilius et al., 2007; Venkatachalam & Montell, 2007). Diese enorme Vielfalt spiegelt sich auch in den biologischen Prozessen wider, an denen TRP-Kanäle beteiligt sind. Sie spielen eine wichtige Rolle bei allen sensorischen Prozessen wie Schmecken, Riechen, Hören, einfachen Formen des Sehens sowie der Schmerzwahrnehmung (Clapham, 2003; Voets et al., 2005; Montell, 2011). Darüber hinaus sind TRPs maßgeblich an Zellproliferations- und Apoptose-Prozessen, an Mechanismen der axonalen Wegfindung sowie an der  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  Homöostase beteiligt (Venkatachalam & Montell, 2007; Minke, 2010; Montell, 2011; Hardie, 2011).

Bedingt durch die Vielzahl an Prozessen, an denen TRP-Kanäle eine entscheidende Rolle spielen, führen Fehlfunktionen dieser Kanäle zu diversen Krankheitsbildern, wie beispielsweise FSGS (focal and segmental glomerulosclerosis [TRPC6])(Winn et al., 2005; Reiser et al., 2005), ADPKD (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease [TRPP1]) (Sutters et al., 2003), HSH (Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalzämie [TRPM6]) (Walder et al., 2002; Schlingmann et al., 2002) sowie MLIV (Mucopolipidosis Type IV [TRPML1]) (Sun et al., 2000; Bassi et al., 2000; Bargal et al., 2000).

Die Erforschung der Struktur-Funktionsbeziehungen von TRP Kanälen liefert wichtige Informationen zum Verständnis des Schaltverhaltens und ist die Voraussetzung für die Aufklärung der Pathomechanismen diverser TRP-Kanalerkrankungen. Darüber hinaus ist die Aufklärung der Funktionsweise von TRP Kanälen auch für viele andere medizinische Bereiche von hohem Interesse. Hierzu gehören die Entwicklung neuartiger Analgetika in der Behandlung chronisch neuropathischer Schmerzen, bei denen der TRPM8-Kanal ein hochrelevantes Target darstellt (Proudfoot et al., 2006) oder zur intensivmedizinischen Behandlung bei Ischämien, wo beispielsweise die gezielte Inhibition des TRPM2-Kanals neuroprotektiv wirkt (Zhang et al., 2006).

### 2.3 Der Kälte- und Menthol-Rezeptor TRPM8

Schon vor etwa 60 Jahren zeigten Hensel und Zottermann, dass bestimmte pflanzliche Wirkstoffe, wie z.B. Menthol, das Antwortverhalten von Trigemini-Neuronen auf eine Kältestimulation verstärken. Sie vermuteten, dass diese kühlenden Substanzen unmittelbar mit Proteinen interagieren, die an der Kälte-transduktion direkt beteiligt sind (Hensel and Zottermann, 1951). Dieser wegweisende Ansatz konnte erst 50 Jahre später experimentell weiter verfolgt werden. Mittels einer cDNA Bibliothek aus dem Gewebe trigeminaler Neurone und Menthol als Screening-Substanz konnte der Kälte- und Menthol-Rezeptor TRPM8 (*transient receptor potential melastatin 8*) schließlich identifiziert und charakterisiert werden (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002).

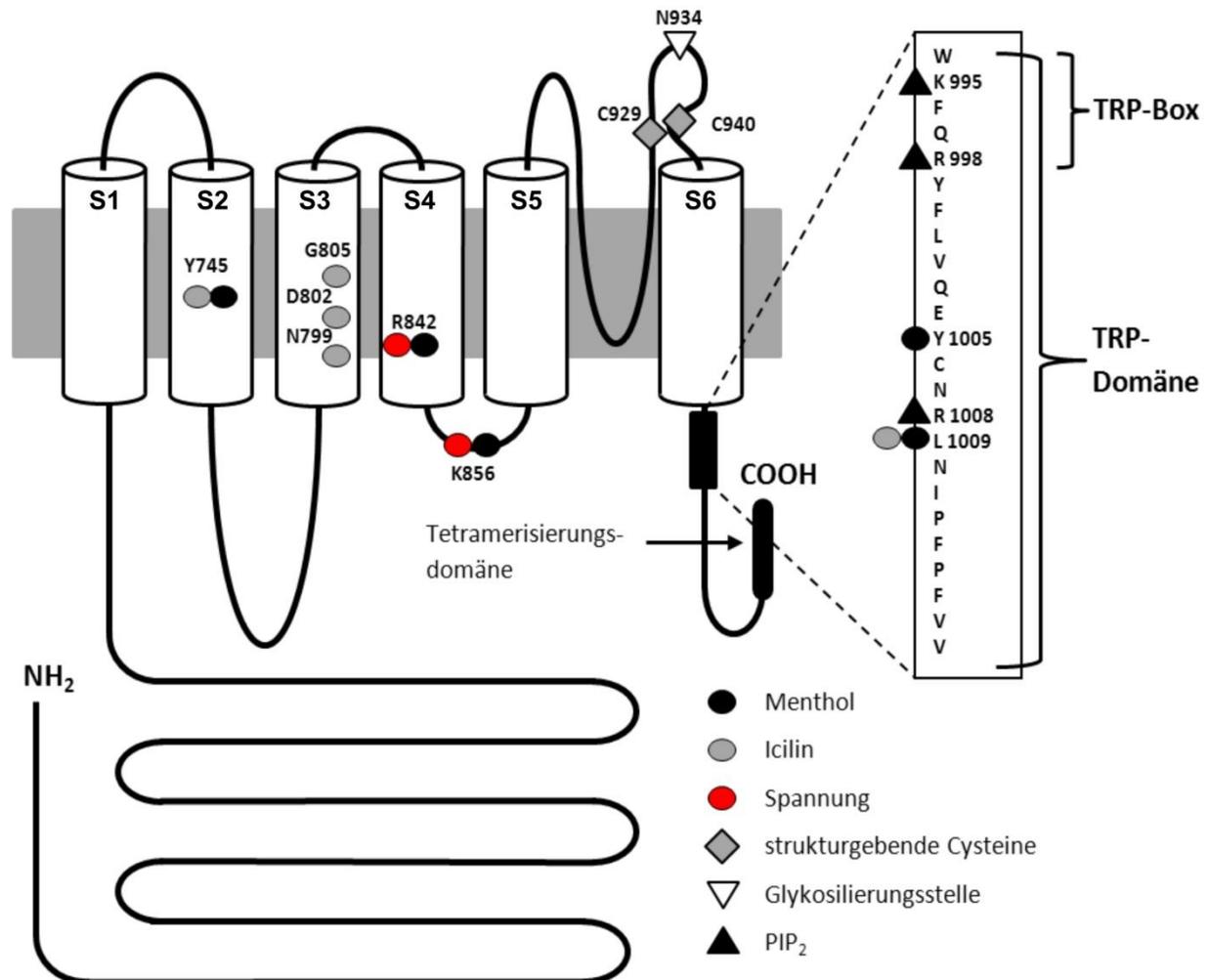
TRPM8 ist ein auswärtsrektifizierender, nicht selektiver Kationenkanal, der durch Temperaturen unterhalb von 26°C sowie durch chemische Substanzen, die ein Kältegefühl vermitteln, aktiviert wird (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). Bei diesen chemischen Aktivatoren handelt es sich sowohl um pflanzliche Wirkstoffe, wie Menthol oder Eukalyptol als auch um synthetische Wirkstoffe, wie beispielsweise Icilin (Wei & Seid, 1983). Die biologische Funktion von TRPM8 als Kältesensor konnte in Verhaltensexperimenten mit TRPM8 *knock-out* Mäusen (TRPM8 *-/-*) nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass isolierte Trigemini-Neurone aus TRPM8 *-/-* Mäusen *in vitro* weder auf Stimulation mit Menthol noch auf Stimulation mit moderater Kälte reagieren (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). Die Expression von TRPM8 findet hauptsächlich in den thermosensitiven Neuronen des somatosensorischen Systems, wie den Spinalganglien (dorsal root ganglia, DRG)

und Trigemini-Neuronen (trigeminal ganglia, TG) statt (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002; Okazawa et al., 2004; Abe et al., 2005). Des Weiteren konnte TRPM8 in der Skelettmuskulatur, der glatten Muskulatur, in Spermien sowie in den Epithelien der Prostata, der Lunge, der Leber und des Urogenitaltraktes nachgewiesen werden. Die funktionelle Rolle von TRPM8 in diesen Geweben konnte bisher nicht aufgeklärt werden (Stein et al., 2004; Mukerji et al., 2006; Fonfria et al., 2006; De Blas et al., 2009; Rohacs & Yudin, 2012).

Die Expression von TRPM8 konnte ebenfalls in verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen werden, u.a. in Prostata-, Brust-, Darm- und Pankreaskrebszellen. Im Gegensatz zum gesunden Gewebe mit einer vergleichbar schwachen TRPM8-Expression, ist diese im tumorösen Gewebe deutlich gesteigert. Die genaue Ursache und Wirkung dieser Überexpression von TRPM8 ist bisher noch nicht geklärt (Tsavaler et al., 2001; Bidaux et al., 2007; Yee et al., 2010; Chodon et al., 2010).

### 2.3.1 Struktur von TRPM8

Die Quartärstruktur eines funktionsfähigen TRPM8-Kanals wird durch ein Homotetramer gebildet, wobei die einzelnen TRPM8-Untereinheiten aus 1104 Aminosäuren aufgebaut sind und ein Molekulargewicht von circa 130 kDa besitzen.



**Abb. 3:** Strukturmodell von TRPM8. Für die Mentholsensitivität von TRPM8 sind sowohl in der Transmembrandomäne S2 und S4 als auch in der TRP-Domäne verschiedene Aminosäurereste von Bedeutung (schwarzer Kreis; Y745, R842, K856, Y1005 und L1009). Die Icilinsensitivität wird von verschiedenen Aminosäureresten in S2, S3 und der TRP-Domäne (grauer Kreis; Y745, N799, D802, G805 und L1009) beeinflusst. Die markierten Aminosäuren (roter Kreis; R842 und K856) in S4 bzw. dem S4-S5 Linker sind an der Spannungssensitivität beteiligt. In der Porenregion befinden sich eine Glykosylierungsstelle (weißes Dreieck; N934) sowie zwei strukturegebende Cysteine (graues Quadrat; C929 und C940). Mögliche PIP<sub>2</sub> Bindestellen befinden sich innerhalb der TRP-Domäne (schwarzes Dreieck; K995, R998 und R1008).

Die Tertiärstruktur der TRPM8-Untereinheiten besteht in Übereinstimmung mit allen anderen TRP-Kanälen aus 6 Transmembrandomänen S1-S6, einer putativen Porenregion zwischen S5 und S6 sowie intrazellulär gelegenen N- und C-terminalen Enden (s. Abb.3) (Yellen, 2002; Tsuruda et al., 2006; Erler et al., 2006). Der proximale Teil des C-Terminus enthält die TRP-Domäne mit einem charakteristischen Sequenzmotiv, der TRP-Box (Clapham, 2003; Montell, 2001; Rohac & Yudin, 2012). Der distale Teil des C-Terminus bildet mit einer Coiled-Coil Region die Tetramerisierungsdomäne (Tsuruda et al., 2006; Erler et al., 2006). Bei TRPM8 handelt es sich um ein Glykoprotein mit der Glykolisierungsstelle (N934) in der putativen Kanal-Pore (Dragoni et al., 2006; Erler et al., 2006). Ebenfalls in dieser Region lokalisiert sind zwei strukturgebende Cysteine an den Positionen 929 und 940 (Dragoni et al., 2006). Der Aminoterminus besitzt keine Ankyrin-Repeats, die ein charakteristisches Strukturmotiv einiger anderer TRP-Kanäle darstellen und an der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Venkatachalam & Montell, 2007). Die Rolle des N-terminalen Endes konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

### 2.3.2 Schaltverhalten von TRPM8

TRPM8 oder auch CMR1 (*cold and menthol receptor 1*) ist ein spannungsabhängiger Kationenkanal mit auswärtsrektifizierenden Leiteigenschaften, wobei die spannungsbedingte Aktivierung des TRPM8-Kanals eine sehr starke Depolarisation benötigt. Moderate Kälte unterhalb von 26°C sowie Menthol und Icilin bewirken eine Links-Verschiebung der Strom-Spannungs-Kurve (I/V-Kurve), so dass eine Aktivierung bei physiologischen Membranpotentialen erfolgen kann (Brauchi et al., 2004; Voets et al., 2004; Rohacs & Yudin, 2012). Zusätzlich induzieren die TRPM8-Agonisten eine Verschiebung der temperaturbedingten Aktivierungsschwelle des Kanals in Richtung höherer Temperaturen (Brauchi et al., 2004; Voets et al., 2004; Rohacs et al., 2005; Rohacs & Yudin 2012).

PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat) ist ein natürlicher Bestandteil der inneren Lipidschicht der Plasmamembran. Mit *Inside-Out* Patchclamp-Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der PIP<sub>2</sub> Konzentration zu einer Desensitivierung, bis hin zum totalen Funktionsverlust von TRPM8 führt (Rohacs et al., 2005; Liu & Qin, 2005). PIP<sub>2</sub> aktiviert TRPM8 im mikromolaren (µM) Bereich und wirkt positiv modulierend auf die spannungsabhängige Aktivierung des Kanals. Darüber hinaus wird auch die Aktivierung durch

Kälte sowie durch chemische Agentien wie Menthol, Eukalyptol oder Icilin durch PIP<sub>2</sub> positiv beeinflusst (McKemy et al. 2002; Peier et al. 2002; Rohacs et al., 2005; Liu & Qin, 2005).

Neben PIP<sub>2</sub> als Hauptagonisten und Modulator der TRPM8-Aktivität sind verschiedene enzymatische Spaltprodukte von Phospholipiden an der Regulation von TRPM8 beteiligt. Die Produkte der Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), Lysophospholipide (LPLs) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs), wie beispielsweise Arachidonsäure (AA), wirken modulierend auf die TRPM8-Aktivität, sind aber für die Funktion des Kanals nicht essentiell. LPLs bewirken eine Verschiebung der temperaturbedingten Aktivierungsschwelle von TRPM8 auf über 30°C, wohingegen Arachidonsäure einen inhibierenden Effekt auf TRPM8 hat. Bei gleichen Konzentrationen von LPLs und AA überwiegt die positive Modulation durch LPLs (Vanden Abeele et al., 2006; Anderson et al., 2007; Zakharian et al., 2010).

Ein weiterer endogener Regulator von TRPM8 ist das Membranprotein Pirt (*phosphoinositide interacting regulator of TRP*). Es konnte gezeigt werden, dass Pirt die Sensitivität von TRPM8 gegenüber Menthol und Kälte verringert. In Knock-Out Experimenten mit *Pirt*<sup>-/-</sup> Mäusen konnte ein vermindertes Ansprechverhalten auf Kältereize gezeigt werden (Tang et al., 2013).

Neben den zuvor beschriebenen Agonisten wird das Schaltverhalten von TRPM8 auch durch Protonen beeinflusst. Eine intrazelluläre Absenkung des pH-Wertes, wie sie zum Beispiel bei entzündlichen Prozessen auftritt, wirkt inhibitorisch auf eine Aktivierung von TRPM8 durch Kälte und Icilin, hat aber keinen Effekt auf die Aktivierung durch Menthol (Andersson et al., 2004).

Nach der Aktivierung von TRPM8 führt ein durch Calcium (Ca<sup>2+</sup>) stimulierter enzymatischer PIP<sub>2</sub>-Abbau zur Desensitivierung von TRPM8 (McKemy et al. 2002; Peier et al. 2002). Dabei induziert das über TRPM8 einströmende Ca<sup>2+</sup> eine Aktivierung des Enzyms Phospholipase C (PLC). Die Aktivität der PLC resultiert in einem Abfall des PIP<sub>2</sub>-Levels und damit einhergehend, in der Desensitivierung von TRPM8 (Rohacs et al., 2005; Daniels et al., 2009). Möglicherweise wird TRPM8 zusätzlich durch die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert sowie desensitiviert (Abe et al., 2005; Prekumar et al., 2005).

## 2.4 TRPM2

Der *transient potential receptor melastatin-2* (TRPM2) ist maßgeblich an durch oxidativen Stress bedingten, apoptotischen Prozessen beteiligt. Die Fähigkeit, auf oxidativen Stress zu reagieren, macht diesen TRP-Kanal zu einem wichtigen Ziel therapeutischer Ansätze, u.a. bei chronisch entzündlichen Prozessen, neurodegenerativen Erkrankungen sowie bei durch oxidativen Stress bedingten Pathologien (Uchida et al., 2010; Sumoza-Toledo & Penner, 2011).

Mit einer Sequenzhomologie von 42% ist TRPM2 der nächste Verwandte von TRPM8 innerhalb der TRP-Familie. Die Sequenzunterschiede zwischen TRPM8 und TRPM2 konzentrieren sich hauptsächlich auf den C-Terminus, wo TRPM2 im Gegensatz zu TRPM8 eine ca. 300 Aminosäurereste umfassende Enzymdomäne besitzt. Wie TRPM8 ist auch TRPM2 ein  $\text{Ca}^{2+}$  permeabler Kationenkanal mit einer TRP-typischen Tertiärstruktur (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001; Peier et al., 2002) und bildet durch Homotetramerisierung einen funktionsfähigen Kanal aus (Nagamine et al., 1998; Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001; Uemura et al., 2005). Trotz einer ausgeprägten Sequenz-Homologie ist das Schaltverhalten dieser beiden Kanäle sehr unterschiedlich. Im Gegensatz zu TRPM8 wird der TRPM2-Kanal u.a. durch Adenosin-Diphosphat-Ribose (ADPR) mit  $\text{Ca}^{2+}$  als Kofaktor aktiviert (Perraud et al., 2001; Hara et al., 2002; Wehage et al., 2002; Inamura et al., 2003) und ist weder spannungsabhängig noch sensitiv für Kälte, Menthol oder Icilin (Kühn et al., 2010).

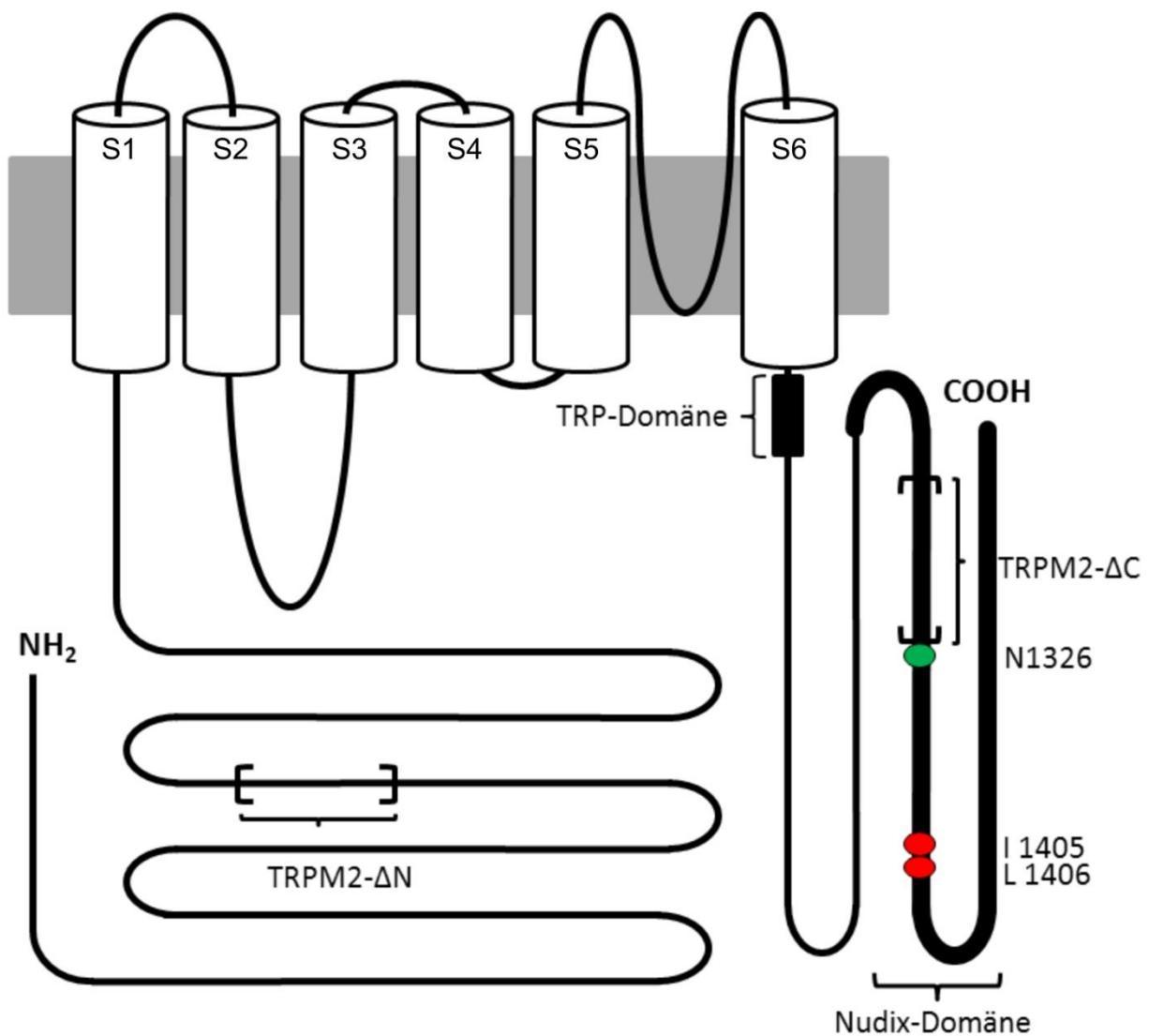
Die strukturellen Gemeinsamkeiten dieser beiden Kanäle, vor dem Hintergrund eines divergierenden Schaltverhaltens, sind ein Ansatzpunkt dieser Arbeit, um die Struktur-Funktions-Beziehungen durch vergleichende Analysen näher zu charakterisieren.

### 2.4.1 Expression von TRPM2

Die Expression von TRPM2 wurde bisher in Zellen der Monocytenfamilie (z.B. in neutrophilen Granulozyten) (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001; Hara et al., 2002), in  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Inamura et al., 2003), in Zellen des Darms (Harteneck, 2005) sowie in verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems (ZNS) nachgewiesen (Kraft et al., 2004).

### 2.4.2 Struktur von TRPM2

Im Gegensatz zu TRPM8 ist TRPM2 mit einer Sequenz von 1503 Aminosäuren Länge und einem Molekulargewicht von ca. 170 kDa deutlich größer (Nagamine et al., 1998; Hara et al., 2002; Jiang et al., 2010).



**Abb. 4:** Strukturmodell von TRPM2. Innerhalb der Nudix-Domäne ist das Asparagin 1326 (grüner Kreis), welches wahrscheinlich an der ADPR-Bindung beteiligt ist, essentiell für die Kanalfunktion. Die Aminosäurereste I1405 und L1406 (roter Kreis) innerhalb der katalytischen Domäne verhindern einen schnellen enzymatischen Abbau von ADPR. Der nicht funktionsfähigen TRPM2 Spleißvariante TRPM2- $\Delta$ N fehlen 20 Aminosäuren innerhalb des cytosolischen N-Terminus. Der Spleißvariante TRPM2- $\Delta$ C hingegen fehlen 34 Aminosäuren innerhalb der Nudix-Domäne.

Dieser Unterschied beruht auf der Präsenz einer C-terminal gelegenen Enzymdomäne, der sogenannten NUDT9-Homology Domäne (NUDT9-H). Diese ca. 300 Aminosäuren umfassende Domäne weist eine sehr große Homologie zu der NUDT9 (human nucleoside diphosphate-linked moiety X-type motif 9) auf, einer Adenosin-Diphosphat-Ribose (ADPR)-Hydrolase (Shen et al., 2003). Das NUDT9-Enzym gehört zu den Pyrophosphatasen und enthält eine hochkonservierte, 22 Aminosäuren umfassende, katalytische Domäne, die sogenannte Nudix Box (Bessman et al., 1996, 2001; Dunn et al., 1999). Diese zeigt bis auf zwei kritische Aminosäurereste eine sehr große Homologie zu der katalytischen Domäne der NUDT9-H-Domäne von TRPM2, die deshalb jedoch nur eine sehr begrenzte, enzymatische Aktivität besitzt (Perraud et al., 2003; Shen et al., 2003; Kühn & Lückhoff, 2004).

Neben der oben beschriebenen Hauptform wurden noch verschiedene Spleißvarianten von TRPM2 beschrieben, wie beispielsweise die Spleißvariante TRPM2- $\Delta$ C, der 34 Aminosäuren innerhalb der NUDT9-Domäne fehlen (Wehage et al., 2002; Kühn & Lückhoff, 2004). Die Funktion der verschiedenen Spleißvarianten von TRPM2 ist bisher weitestgehend unklar. Es wird jedoch eine regulatorische Funktion und ein Einfluss auf die TRPM2 Aktivität angenommen (Zhang et al., 2003; Uemura et al., 2005).

### **2.4.3 Schaltverhalten von TRPM2**

Für den TRPM2-Kanal sind, im Gegensatz zu den meisten anderen Kationenkanälen, besonders lange Einzelkanaloffenzeiten von teilweise mehreren Sekunden Dauer und mit einer Einzelkanal-Leitfähigkeit im Bereich von 60 bis 80 pS charakteristisch (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001; Heiner et al., 2003).

Der Hauptagonist des TRPM2-Kanals ist Adenosin-Diphosphat-Ribose (ADPR). Mit Inside-Out-Patch-Clamp-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die benötigte ADPR-Konzentration, die zur Aktivierung führt, von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig ist. Diese Konzentration liegt im Bereich von 10  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  (Perraud et al., 2001). Die Dosis-Wirkungs-Kurve für ADPR wird unter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwirkung stark nach links verschoben.  $\text{Ca}^{2+}$  reicht alleine jedoch nicht aus, um TRPM2 zu aktivieren (Perraud et al., 2001). Es stellt aber einen wichtigen Kofaktor dar, der essentiell für die Funktion von TRPM2 ist. (McHugh et al., 2003; Tong et al., 2006; Starkus et al., 2007).

Ein weiterer Aktivator von TRPM2 ist oxidativer Stress, der experimentell durch Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) simuliert wird, dem einzigen bisher bekannten extrazellulär wirksamen Aktivator von TRPM2 (Hara et al., 2002; Wehage et al., 2002; Inamura et al., 2003). Oxidativer Stress bewirkt u.a. Schädigungen der DNA, die wiederum zur Aktivierung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARP) und Poly(ADPR)-Glykohydrolyasen (PARG) führen. PARP-Enzyme katalysieren die Bildung von ADPR-Polymeren, die wiederum von PARG-Enzymen zu ADPR abgebaut werden. Es wird daher vermutet, dass oxidativer Stress über die Bildung von ADPR aus Poly-ADPR eine Aktivierung von TRPM2 bewirkt (Hara et al., 2002; Ame et al., 2004; Perraud et al., 2005; Fauzee et al. 2010).

Ebenso wie bei TRPM8 beobachtet, übt das Phospholipid  $\text{PIP}_2$  auch auf die TRPM2-Kanalaktivität eine regulatorische Funktion aus. Es konnte gezeigt werden, dass  $\text{PIP}_2$  positiv regulierend auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität des TRPM2-Kanals wirkt und schon geringe Mengen ausreichen, um eine maximale Kanalaktivität zu gewährleisten. Experimentell konnte der Funktionsverlust von TRPM2 durch die Bindung des freien  $\text{PIP}_2$  gezeigt werden. Es wird angenommen, dass  $\text{PIP}_2$  über eine starke Bindung regulatorisch auf das Schaltverhalten von TRPM2 einwirkt, wobei der genaue Mechanismus jedoch noch nicht aufgeklärt werden konnte (Tóth & Csanády, 2012).

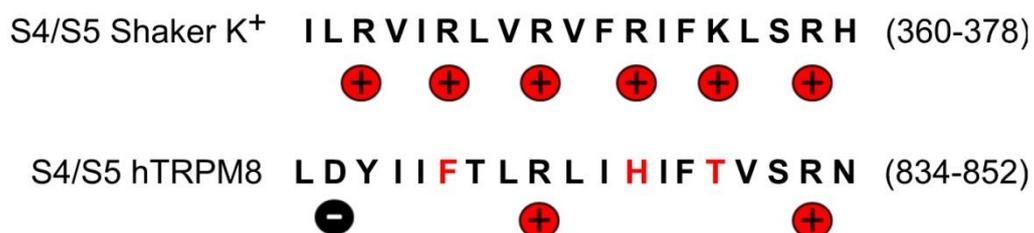
Der TRPM2-Kanal zählt nicht zu den klassischen Thermo-TRP-Kanälen des somatosensorischen Systems, wie TRPM8 oder TRPV1 (Venkatachalam & Montell, 2007), ist aber dennoch temperatursensitiv. Bei Temperaturen über  $35^\circ\text{C}$  wird der TRPM2-Kanal *in vitro* direkt aktiviert (Togashi et al., 2006). Darüber hinaus führt die Kombination von hohen Temperaturen mit ADPR oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu einer starken Linksverschiebung der jeweiligen Dosis-Wirkungs-Kurve (Togashi et al., 2008).

Das Schaltverhalten von TRPM2 kann, ebenso wie bei TRPM8, durch Protonen beeinflusst werden, wobei ein Absenken des pH-Wertes sowohl extrazellulär als auch intrazellulär eine Inhibition der Kanal-Aktivität bewirkt. Ab einem pH-Wert von 5 - 6 ist daher eine Aktivierung von TRPM2 nicht mehr möglich (Du et al., 2009; Starkus et al., 2010; Yang et al., 2010).

## 2.5 Bekannte Struktur-Funktionsbeziehungen von TRPM8

Der genaue Mechanismus, durch den bei TRPM8 das Gating induziert wird, konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Es wird jedoch ein Gatingmechanismus vermutet, der in seinem Schaltverhalten dem der klassischen spannungsabhängigen Kationen-Kanäle ähnelt, wie z.B. den Kaliumkanälen vom Typ „*Shaker*“ (Voets et al., 2004). Für *Shaker* K<sup>+</sup>-Kanäle konnte gezeigt werden, dass basische und saure Aminosäurereste in den Transmembrandomänen S2, S3 und S4 elektrostatische Interaktionen eingehen, die die Struktur des Kanals stabilisieren und deutliche funktionelle Auswirkungen auf die Aktivierung haben (Papazian et al., 1995).

Wie auch im *Shaker* konnte den Transmembrandomänen S2, S3 und S4 von TRPM8 eine entscheidende Rolle für die Funktion des Kanals nachgewiesen werden. Die Transmembrandomäne S4 sowie die S4/S5 Linkerregion enthalten beispielsweise positiv geladene Aminosäurereste, die wesentlich zur Spannungssensitivität von TRPM8 beitragen. Wie von Voets et al. (2007) gezeigt, wird die Spannungssensitivität von TRPM8 dabei maßgeblich von den zwei basischen Aminosäureresten (R842; K856) bestimmt. Im Gegensatz zu den *Shaker* K<sup>+</sup>-Kanälen fehlt dem TRPM8-Kanal jedoch ein klassischer S4-Spannungssensor in Form von regelmäßig angeordneten, positiv geladenen Aminosäuren.



**Abb. 5:** Vergleich des S4 Spannungssensors des *Shaker* K<sup>+</sup>-Kanals mit der homologen Region des humanen TRPM8. Bei TRPM8 umfasst diese Region den Bereich von S4 und den S4/S5 Linker. Die positiven bzw. negativen Ladungen sind durch + bzw. - gekennzeichnet. (vgl. Kühn et al., 2013)

Trotz intensiver Studien konnte weder der genaue Mechanismus der durch chemische Agonisten vermittelten Aktivierung aufgeklärt noch mögliche Bindestellen eindeutig identifiziert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl Aminosäurereste in S2, S4 so-

wie in der S4/S5 Linkerregion an der Interaktion von Menthol mit dem TRPM8-Kanal beteiligt sind. Dabei tragen die Aminosäurereste R842 in S4 und K856 in S4/S5, die auch für die Spannungsabhängigkeit von TRPM8 von Bedeutung sind, maßgeblich sowohl zur Bindung als auch zur Sensitivität des Kanals gegenüber Menthol bei (Voets et al., 2007). Darüber hinaus ist der Aminosäurerest Y745 in der Transmembrandomäne S2 essentiell für die Sensitivität von TRPM8 gegenüber Menthol (Bandell et al., 2006). Mit einem umfassenden Screeningverfahren konnten neben Y745 in S2 noch zwei weitere Aminosäurereste (Y1005, L1009) innerhalb der TRP-Domäne bestimmt werden, deren Mutation zu einer Beeinträchtigung der Mentholsensitivität führt (Bandell et al., 2006)

Für die Icilinsensitivität des TRPM8-Kanals sind verschiedene Aminosäurereste der Transmembrandomänen S2, S3 sowie der TRP-Domäne von Bedeutung. Die Aminosäurereste Y745 in S2 und L1009 in der TRP-Domäne sind nicht nur für die Mentholsondern auch für die Icilinsensitivität von Bedeutung (Bandell et al., 2006). Zusätzlich konnte eine Forschergruppe 2004 durch die Analyse Spezies-spezifischer Unterschiede von TRPM8 aus Ratte (rTRPM8) und aus Huhn (cTRPM8) nachweisen, dass das Glycin an Position 805 innerhalb der Transmembrandomäne S3 in rTRPM8 (A796 in cTRPM8) essentiell für die Icilinsensitivität ist. Im Zuge dieser Untersuchung konnte weiterhin gezeigt werden, dass neben G805 auch die Aminosäurereste N799 und D802 innerhalb der Transmembrandomäne S3 entscheidend für die Aktivierbarkeit des TRPM8-Kanals durch Icilin sind. Mutationen an diesen Positionen führen zum selektiven Verlust der Icilinsensitivität (Chuang et al., 2004).

Der Mechanismus der Kälteaktivierung von TRPM8 ist weitestgehend unklar. Wichtig für die Temperatursensitivität sind sowohl Aminosäurereste in S4, S4/S5 sowie Sequenzbereiche des C-Terminus (Brauchi et al., 2006; Voets et al., 2007). Es wurden verschiedene basische Aminosäurereste in der Transmembrandomäne S4 und in der S4/S5 Linkerregion identifiziert, deren Neutralisation die Temperatursensitivität des Kanals beeinflussen. Auf diese Weise führen Neutralisationsmutationen an Position R842, H845, R851 und R862 zu einer Abnahme der Temperatursensitivität. Die TRPM8-Mutante K856A ist die einzige bekannte Neutralisationsmutante, bei der die Temperaturempfindlichkeit gesteigert wird (Voets et al., 2007). Welche Aminosäurereste im C-terminalen Sequenzbereich von TRPM8 im Detail an der Kälteaktivierung beteiligt sind, ist bisher unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass

der C-Terminus im Ganzen eine wichtige Funktion für die Temperatursensitivität von TRPM8 ausübt. Der Austausch der C-terminalen Enden zwischen TRPM8 und dem hitzeaktivierbaren TRPV1 führt bei der TRPM8-Chimäre mit einem TRPV1-C-Terminus zur TRPV1 typischen Temperaturaktivierung ab 42°C. Ebenso lässt sich die für TRPM8 typische Kälteaktivierung durch eine Übertragung des TRPM8-C-Terminus auf TRPV1 beobachten (Brauchi et al., 2006).

Der genaue Mechanismus der PIP<sub>2</sub> vermittelten Aktivierung und Regulation von TRPM8 ist noch nicht aufgeklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass verschiedene basische Aminosäurereste innerhalb der C-terminal gelegenen TRP-Domäne für die Interaktion des Kanals mit PIP<sub>2</sub> wichtig sind. Mutationen der basischen Aminosäurereste K995, R998 und R1008 führen zu einer verminderten PIP<sub>2</sub>-Sensitivität sowie zu einer gesteigerten Inhibition der Kanalfunktion bei Reduktion des PIP<sub>2</sub>-Levels (Rohacs et al., 2005).

Wie viele andere Ionenkanäle wird auch der TRPM8-Kanal post-translational durch Glykosylierung modifiziert. Die Glykosylierungsstelle bildet ein Asparagin an Position 934 innerhalb der Porenregion des Kanals. Wie von Pertusa et al. (2012) gezeigt, führt ein Fehlen dieser Glykosylierung, hervorgerufen durch Behandlung mit dem Antibiotikum Tunicamycin oder durch eine Punkt-Mutation der Glykosylierungsstelle (N934Q), zu einer Herabsetzung der Menthol- und Temperatur-Sensitivität (Pertusa et al., 2012).

## 2.6 Bekannte Struktur-Funktionsbeziehungen von TRPM2

Im Gegensatz zu TRPM8 gibt es bei TRPM2 bislang wenig strukturelle Informationen bezüglich der Aktivierung des Kanals. Die Bindung von ADPR an die intrazellulär gelegene NUDT9-H-Domäne sowie die Bindung von Ca<sup>2+</sup> an die intrazelluläre Seite der Kanalpore stellen vermutlich Schlüsselereignisse dar (Perraud et al., 2001; Csanady & Töröcsik, 2009). Wie genau die Bindung von ADPR im Zusammenspiel mit Ca<sup>2+</sup> zur Öffnung des TRPM2-Kanals führt ist jedoch noch ungeklärt. Bekannt ist, dass innerhalb der NUDT9-H-Domäne die Aminosäurereste N1326, I1405 und L1406 essentiell für die Kanalaktivierung durch ADPR sind. Zusätzlich scheint das Asparagin an Position 1326 an einer Bindung von ADPR beteiligt zu sein (Kühn & Lückhoff 2004). Die Aminosäuren I1405 und L1406 sind kritische Sequenzunterschiede innerhalb der Nudix-Box, verglichen mit der katalytischen Domäne der NUDT9-Pyrophosphatase (E1405; F1406). Diese Sequenzunterschiede bewirken eine starke Redukti-

on der Enzymaktivität der Nudix-Box und verlangsamen somit den enzymatischen Abbau der gebundenen und für die Kanalaktivierung wichtigen ADPR (Perraud et al., 2003).

Interessanterweise weist der TRPM2-Kanal innerhalb der Transmembrandomäne S4 und in der S4/S5-Linkerregion eine hohe Sequenzübereinstimmung zum TRPM8-Kanal auf. Wie TRPM8 besitzt der TRPM2-Kanal dieselben basischen Aminosäurereste in dieser Region, ist aber im Gegensatz zu diesem nicht spannungsabhängig.

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede in der Spannungssensitivität von Unterschieden der S5-Pore-S6-Region herrühren, wurden Kanalchimären zwischen TRPM8 und TRPM2 mit der Porenregion des jeweils anderen Kanals untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die S5-Pore-S6 Region wichtig für das Schaltverhalten von TRPM8 ist, da TRPM8-Chimären mit der TRPM2-Porenregion einen kompletten Funktionsverlust zeigen. Im Gegensatz dazu verhalten sich TRPM2-Chimären mit der TRPM8 Porenregion nahezu identisch, wie der wt-TRPM2-Kanal (Kühn et al., 2010).

Inwieweit die Transmembrandomäne S3 mit dem potentiellen Spannungssensor in S4 bzw. dem S4/S5-Linker interagiert, ist bislang nicht experimentell untersucht worden. Eine für den TRPM8-Kanal durchgeführte Computersimulation deutet jedoch auf eine Interaktion zwischen dem sauren Aminosäurerest D802 der S3 und dem basischen Aminosäurerest R842 der S4 hin (Pedretti et al., 2011). Diese Aminosäurereste sind ebenfalls im TRPM2-Kanal konserviert (D872 der S3 und R909 der S4).

## 2.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, ein Computersimulationsmodell über das Schaltverhalten von TRPM8 (Pedretti et al., 2009; 2011) experimentell zu überprüfen und dadurch den spannungsabhängigen Aktivierungsmechanismus von TRPM8 weiter aufzuklären. Im Speziellen wurde eine, im Modell konkret postulierte, direkte elektrostatische Interaktion zwischen den Transmembrandomänen S3 und S4 untersucht. Da ein bestimmter Sequenzabschnitt innerhalb des Transmembransegments S3 sowohl bei den klassischen spannungsabhängigen Kationenkanälen als auch bei einigen TRP-Kanälen hochkonserviert ist, war auch die Aufklärung der funktionellen Rolle von S3 für das spannungsabhängige Schaltverhalten von TRPM8 sowie für das spannungsunabhängige Schaltverhalten von TRPM2 wichtig. Durch umfangreiche Mutationen im Bereich S3/S4 sollten gezielt Ladungen modifiziert und die daraus resultierenden funktionellen bzw. strukturellen Veränderungen analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können das bislang favorisierte Modell eines klassischen spannungsabhängigen S4-Spannungssensors bei TRPM8 nicht stützen sondern liefern konkrete Hinweise auf einen modifizierten spannungsabhängigen Aktivierungsmechanismus unter Beteiligung des Transmembransegments S3 sowie möglicherweise auch des Membranphospholipids PIP<sub>2</sub>.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

ADPR	Adenosin 5'-Diphosphat-Ribose, Sigma-Aldrich, 100 mM Stocklösung in ddH <sub>2</sub> O
Ampicilin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bicin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, Deutschland
BSA	Albumin aus Rinderserum, Sigma-Aldrich, Deutschland
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid, Merck, Deutschland
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biochrom, Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid, Roth, Deutschland
DTT	Dithiothreitol, Sigma-Aldrich, Deutschland
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Sigma-Aldrich, Deutschland
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, Sigma-Aldrich, Deutschland
Essigsäure	25%, Roth, Deutschland
Ethanol	Roth, Deutschland
Ethidium-Bromid	Lösung (5 µg/ml) Sigma-Aldrich, Deutschland
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum), Hitze inaktiviert, Sigma-Aldrich, Deutschland
FuGene 6	Transfektionsreagenz, Roche, Deutschland

Glycerol	Sigma-Aldrich, Deutschland
HCl	Salzsäure, Merck, Deutschland
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Sigma-Aldrich, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid, Merck, Deutschland, 30% Stocklösung
Icilin	1-(2-Hydroxyphenyl)-4-(3-Nitrophenyl)-3,6-Dihydropyrimidin-2-one, Cayman Chemical, USA, 10 mM Stocklösung in DMSO
KCl	Kaliumchlorid, Merck, Deutschland
L-Glutamin	200 mM, Biochrom, Deutschland
Luminol	Perkin-Elmer, USA
Menthol	Sigma-Aldrich, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Merck, Deutschland
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Merck, Deutschland
Milchpulver (Trockenmilch)	Roth, Deutschland
NaCl	Natriumchlorid, Merck, Deutschland
NaOH	Natriumhydroxid, Merck, Deutschland
Na-Pyruvat	Natriumpyruvat, Biochrom, Deutschland
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin, Sigma-Aldrich, Deutschland
PBS	Phosphate Buffered Saline(Phosphatgepufferte Salzlösung), Biochrom, Deutschland
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid, Serva, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Deutschland

SDS	Natriumdodecylsulfat, Roth, Deutschland
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Merck, Deutschland
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Chlorwasserstoff, Merk, Deutschland
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypsin	Biochrom, Deutschland
Tween	Roth, Deutschland

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Borosilikatglas, Länge 75 mm, Außendurchmesser 1,8 mm, Wandstärke 0,36 mm	Hilgenberg, Deutschland
Deckgläser, 24 mm $\varnothing$ , Stärke 0	Menzel-Gläser, Deutschland
Einmal-Dentalkanüle, Länge 40 mm, 0,4 mm $\varnothing$	Braun, Deutschland
Falcon-Kulturschalen, 100 x 20 mm	Becton Dickinson, USA
Falcontube 10 ml / 15 ml / 50 ml	Becton Dickinson, USA
Gradientengel, NuPAGE® Novex®, Lifetechnologies™, 4 - 12% Bis-Tris SDS-PAGE	Lifetechnologies™, USA
Immun-Blot™ PVDF-Membran, 0,2 $\mu$ m	Bio-Rad, USA
Kulturschalen, 34 x 10 mm	TIPP, Schweiz
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml / 2 ml	Eppendorf, Deutschland
Sterilfilter Millex®-GS, Porendurchmesser 0,22 $\mu$ m	Merck, Deutschland
Whatmanpapier, Porengröße 0,45 $\mu$ m	Schleicher & Schuell, Deutschland
Zellschaber	GE Lifescience, Großbritannien

**3.1.3 Geräte**

Agarosegel-System	Powerpack 300	Bio-Rad, USA
Analysewaage	RC 250S	Sartorius
Bad-Umwälz-Thermostat	RC6	Lauda, Deutschland
Blot-Dokumentationssystem	Chemi-Smart 5100	Vilber, Frankreich
Brutschrank (Bakterien)	EB 170S	Jouan, Deutschland
Brutschrank (Zellkultur)	Hera-Cell 150 Funktion Line	Heraeus, Deutschland
Computer	Optiplex 780	Dell, USA
Gel-Dokumentationssystem	Gel-Hood	Intas, Deutschland
Heizblock	BT 1301	HLC (Ditabis), Deutschland
Mikromanipulatoren	Unit MRE / MLE (3 axes Mini 25 )	Luigs & Neumann, Deutschland
Mikroskop	Axiovert S 100 Eclipse TS 100	Zeiss, Deutschland Nikon, Japan
Mikrowelle		Bosch, Deutschland
Patch-Clamp-Verstärker	EPC9	HEKA Elektronik, Deutschland
Perfusionssystem / Pumpen	Minipuls 2 Pump P-1	Gilson, Frankreich Parmacia Biotech, Schweiz
pH-Meter	744 pH Meter	Metrohm, Schweiz
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Deutschland
Pipetten	Research® (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Deutschland
Pipettierhilfen	Powerpette Plus	Jencons, USA
Pipetten-Puller	DMZ-Universal-Puller	Zeitz-Instruments, Deutschland
Reinraumwerkbank	HS 15	Heraeus, Deutschland

Schüttel-Inkubator	AK 82	Infors, Schweiz
SDS-PAGE-System	X Cell <i>Sure Lock</i> <sup>™</sup>	Lifetechnologies <sup>™</sup> , USA
Sonificator	Branson Sonifier 150	Heinemann, Deutschland
Thermo-Cycler	Primus	MWG Biotech, Deutschland
Vortex-Schüttler	Reax 2000	Heidolph, Deutschland
Wasserbad	D1	Haake, Deutschland
Western-Blot-System	X Cell <i>Sure Lock</i> <sup>™</sup> X Cell II Blot Module	Lifetechnologies <sup>™</sup> , USA
Zentrifugen	Centrifuge 5415R Multifuge 1S-R Ultrazentrifuge L8-70M	Eppendorf, Deutschland Heraeus, Deutschland Beckman, Deutschland

### 3.1.4 Software

Exel	Microsoft, USA
Powerpoint 2010	Microsoft, USA
Prism 4	Graph-Pad, USA
Puls 8.65	Heka, Deutschland

### 3.1.5 Kits

EndoFree <sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
One Shot <sup>®</sup> INV $\alpha$ F' Chemically Competent E. coli	Lifetechnologies <sup>™</sup> , USA
Pierce <sup>®</sup> Cell Surface Protein Isolation-Kit	Thermoscientific, Deutschland
QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quickchange II Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, USA
Quick Ligation Kit	New England Biolabs, USA

Western Lightning® ECL	Perkin-Elmer, USA
------------------------	-------------------

### 3.1.6 Antikörper

Primärantikörper	
rabbit anti human-TRPM8 monoklonal 1:1000	Abcam, Großbritannien
rabbit anti human-TRPM2 polyklonal 1:1000	Abcam, Großbritannien
Sekundärantikörper	
goat anti rabbit HRP-kojugiert 1: 1000	DAKO Dänemark

### 3.1.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotidprimer wurden von der Firma MWG Biotech (Deutschland) synthetisiert.

Mutanten TRPM8 S3	5' → 3'	Länge [nt]
N799D	gacctgtgggatgtgatggacacgctggggc	31
D802N	gacctgtggaatgtgatgaacacgctggggc	31
N799D + D802N	gacctgtgggatgtgatgaacacgctggggc	31
V800K + M801L	ctgacctgtggaataagcttgacacgctggggc	33
D796R	ggggtgaattattttacgcgctctgtggaatgtgatgg	37
D802R	cctgtggaatgtgatgcgtacgctggggctttttac	37
D796R + D802R	ggggtgaattattttacgcgctctgtggaatgtgatgcg	38
D796R + N799R + D802R	gtgaattattttacgcgcctgtggagggtgatgcgtacgc	40

Mutanten TRPM8 S4	5' → 3'	Länge [nt]
D835R	ggacgagtcattttctgtctgcgctacattattttcactc	40
F839R	gtctggactacattattcgtacgctaagattgatccac	38
R842E	cattattttcactctcgagttgatccacatttttactg	37
R842D	cattattttcactctcgacttgatccacatttttactg	37
H845R	gactacattattttacgctaagattgatccgatttttactg	43
F839R + H845R	gactacattattcgtactctaagattgatccgatttttactg	43
F839R + H845R + T848K	ccgatttttaaagtaagcagaaacttaggaccc	39

Mutanten TRPM2 S3	5' → 3'	Länge [nt]
N869D	gacttctgggataagctggacgtcggcgc	29
D872N	gacttctggaataagctgaacgtcggcgc	29
N869D + D872N	gacttctgggataagcttaacgtcggcgc	29
K870V + L871M	gacttctggaatgtgatggacgtcggcgccatcttgctc	39

### 3.1.8 Enzyme

DpnI	Stratagene, USA
Pfu-Turbo-DNA-Polymerase	Stratagene, USA
Restriktions-Endonukleasen (z.B. EcoRI, XbaI)	New England Biolabs, USA
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, USA

**3.1.9 Standards**

GeneRuler 100bp DNA-Ladder	Thermoscientific, Deutschland
GeneRuler 1kb DNA-Ladder	Thermoscientific, Deutschland
PageRuler Prestained Protein-Ladder	Thermoscientific, Deutschland

**3.1.10 E. coli Bakterien, Zelllinien****E. coli Bakterien:**

One Shot® INVαF' Chemically Competent E. coli	Lifetechnologies™, USA
---	------------------------

**Zelllinien:**

Humane embryonale Nierenzelllinie 293 (HEK-293)	American Type Culture Collection
---	----------------------------------

**3.1.11 Medien und Lösungen****3.1.11.1 Bakterielle Zellkultur:**

2xYT-Medium	Becton Dickinson, USA
2xYT-Medium + Ampicilin	100 µg/ml Ampicilin
LB-Agarplatten	15 g/l Agar in LB-Medium
LB-Agarplatten + Ampicilin	100 µg/ml Ampicilin
S.O.C-Medium	Lifetechnologies™, USA

**3.1.11.2 Zellkultur:**

Zellkulturmedium: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Biochrom, Deutschland	mit 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> mit 25 mM HEPES mit 4,5 g/l D-Glucose mit 4,4 g/l NaCl ohne L-Glutamin ohne Na-Pyruvat
Zellkulturmedium für native <i>Human Embryonic Kidney</i> (HEK)-Zellen (menschliche embryonale Nierenzellen)	450 ml DMEM 50 ml fetales Kälberserum (FCS), <i>fetal calf serum</i> ), inaktiviert und steril filtriert 10 ml L-Glutamine 5 ml Na-Pyruvat
Pufferlösung: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline solution (PBS), Biochrom, Deutschland	ohne Ca <sup>2+</sup> ohne Mg <sup>2+</sup>
Trypsin-EDTA Lösung (0.05 % in PBS)	0,4 ml Trypsin 2,5% 19,2 ml PBS 0,4 ml EDTA 1%
Poly L-Lysin	0,1 mg/ml Polylysin-Hydrobromid

**3.1.11.3 Proteinbiochemische Arbeiten:**

Lyse-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EDTA 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
Lysepuffer + Protease-Inhibitor	50 mM Tris-HCl, pH 7.5 10 mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EDTA 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 1% Protease-Inhibitor

1x Mospuffer pH 7,7	2,5 mM Mops 2,5 mM Tris Base 0,005% SDS 0,05 mM EDTA auf 500ml
Sample-Puffer	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8 50 mM DTT, 10% Glycerol 1% SDS
Solubilisierungspuffer	1 x PBS 0,2% SDS 1 mM PMSF 1 : 100 Proteasen Inhibitor (PI)
1x Transferpuffer pH 7,2	1,25 mM Bicin 1,25 mM Bis-Tris Base 0,05 mM EDTA

#### 3.1.11.4 Elektrophysiologische Arbeiten:

Standard Badpuffer (Bp1)	140 mM NaCl 1,2 mM MgCl <sub>2</sub> 1,2 mM CaCl <sub>2</sub> 5 mM KCl 10 mM HEPES pH 7,4 (NaOH)
Standard Badpuffer mit NMDG (Bp2N)	150 mM NMDG 1,2 mM MgCl <sub>2</sub> 1,2 mM CaCl <sub>2</sub> 5 mM KCl 10 mM HEPES pH 7,4 (HCl)

Pipettenlösung (P11)	145 mM CsCl 8 mM NaCl 2 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM HEPES pH 7,2 (CsOH) 10 mM EGTA -> (Ca <sup>2+</sup> < 10nM)
Pipettenlösung (P11*)	145 mM CsCl 8 mM NaCl 2 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM HEPES pH 7,2 (CsOH) Die Ca <sup>2+</sup> -Konzentration beträgt 1 µM. Berechnet mit dem MAXC-Programm (0,866 mM CaCl <sub>2</sub> und 1 mM EGTA)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Kultivierung von menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-293-Zellen)

Die HEK-293-Zellen (American Type Culture Collection, ATCC, USA) werden bei 37°C in wasserdampfgesättigter 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (Zellinkubator, Heraeus, Deutschland) kultiviert. Die Anzucht findet in 100 x 20 mm Kulturschalen (BD Falcon, USA) statt. Als Nährmedium werden 10 ml DMEM, supplementiert mit 10% FCS, 2% L-Glutamin sowie 1% Na-Pyruvat verwendet. Ab einer Konfluenz von ca. 80% werden die Zellen passagiert. Die Durchführung sämtlicher die Zellkultur betreffender Arbeiten findet unter sterilen Bedingungen und ohne Verwendung von Antibiotika statt. Vor Gebrauch erfolgt eine Erwärmung aller verwendeten Lösungen auf 37°C. Für die Passage der Zellen werden diese mit 10 ml PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung versetzt, für eine Minute im Brutschrank bei 37°C inkubiert und anschließend durch Schwenken der Kulturschale vom Boden gelöst. Nach diesem Schritt wird die Zellsuspension in 9 ml neuem Zellkulturmedium resuspendiert und in einem Verhältnis (Zellsuspension: neues Nährmedium) von 1 : 5 und 1 : 10 in neue Kulturschalen überführt. Die Passage der Zellen findet in Abhängigkeit von der Zelldichte alle 2 - 3 Tage statt.

### 3.2.1.2 Transfektion von HEK-293-Zellen

Die Transfektion erfolgt 24 h nach Umsetzen der Zellen in neue Kulturschalen (100 x 20 mm) und bei einer Konfluenz von ca. 50 – 70%. Für die Transfektion werden 570 µl DMEM ohne FCS, L-Glutamin und Na-Pyruvat mit 27 µl Transfektionsreagenz (FuGENE 6, Roche, Schweiz) versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 µg Plasmid-DNA (Expressionsvektor, s. Kap 3.3.5) erfolgt eine Inkubation des Transfektionsmediums für weitere 30 – 45 min bei Raumtemperatur und wird im Anschluss auf die zu transfizierenden Zellen getropft. Anschließend findet eine Inkubation der Zellen über 24 h unter Zellkulturbedingungen im Brutschrank statt. Die Transfektionsrate wird mittels eines Mikroskops 24 h nach der Transfektion durch UV-Anregung der Kultur bestimmt. Das, auf dem Expressions-Plasmid mitcodierte, koexprimierte GFP (engl. *green fluorescent protein*) stellt dabei einen Marker für eine erfolgreiche Transfektion dar.

Für die Patch-Clamp-Experimente werden die Zellen nach erfolgreicher Transfektion, wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben, mit PBS gewaschen, abgelöst, vereinzelt (resuspendiert) und in geeigneter Zelldichte ausplattiert. Das Ausplattieren findet dabei unter Verwendung von jeweils 2 ml Zellsuspension in 34 x 10 mm Kulturschalen (TIPP, Schweiz) auf mit Polylysin beschichteten (s. Kap. 3.2.1.3) 24 mm ø Deckgläsern der Stärke 0 (Menzel-Gläser, Deutschland) statt. Eine Inkubation über Nacht im Brutschrank bewirkt das Anhaften der Zellen auf den Deckgläsern.

### 3.2.1.3 Beschichtung der Deckgläser

Das Wachstum sowie die Anheftung der HEK-293-Zellen an das Substrat (Kunststoff, Glas) werden u.a. durch die Kulturbedingungen (Temperatur, Medium, CO<sub>2</sub>) aber auch durch das verwendete Substrat beeinflusst. Durch die Beschichtung der Deckgläser mit einem Adhäsionsfaktor wie Polylysin kann ein gesteigertes Zellwachstum und eine bessere Anheftung erreicht werden.

Um, wie für die Patch-Clamp-Messungen essentiell, eine stabile Anheftung der HEK-293-Zellen an die Deckgläser zu erreichen, wurden diese wie folgt mit Polylysin beschichtet: Zunächst erfolgte eine Reinigung der verwendeten Deckgläser mit Methanol und anschließender Abflämmung. Daraufhin wurden die Deckgläser in 34 x 10 mm Kulturschalen (TIPP, Schweiz) überführt und jeweils mit 50 µl Polylysin (0,1 mg/ml) unter Verwendung eines Glaspatels gleichmäßig bedeckt. Nach 30 Minuten wurde überschüssiges Polylysin durch zweifaches Waschen mit 2,5 ml 1x PBS von den Deckgläsern entfernt. Die anschließende Ausplat-

tierung der zu untersuchenden HEK-293-Zellen erfolgte in geeigneter Dichte auf die vorbereiteten Deckgläser.

### 3.2.2 Elektrophysiologie

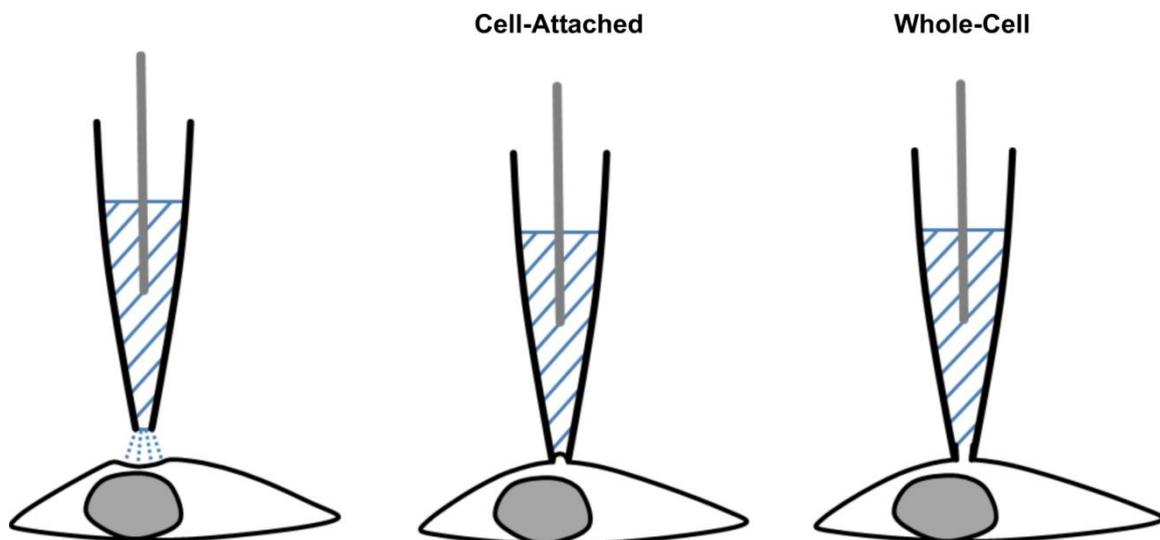
#### 3.2.2.1 Elektrophysiologische Messungen (Patch-Clamp-Technik)

Die elektrophysiologischen Messungen in dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik durchgeführt, eine in der Elektrophysiologie etablierte Messmethode, die u.a. der Erforschung und Charakterisierung von Ionenkanälen dient. Gemessen werden dabei Ionenströme im Picoampere-Bereich ( $10^{-12}$  Ampere), die durch in der Zellmembran lokalisierte Ionenkanäle fließen.

#### 3.2.2.2 Durchführung einer Patch-Clamp-Messung

Die Patch-Clamp-Messungen in dieser Arbeit wurden ausschließlich in der sogenannten Whole-Cell-Konfiguration (engl. *whole cell* – ganze Zelle) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde zuerst die mit Pipettenpuffer gefüllte Patch-Pipette in einen Vorverstärker montiert. Ein mit dem Vorverstärker verbundener, mit Silberchlorid beschichteter Silberdraht (0,25 mm  $\varnothing$ ), der innerhalb der Patch-Pipette bis in den Pipettenpuffer reicht, stellt dabei die Verbindung zum Patch-Clamp-Verstärker (EPC9, HEKA Elektronik, Deutschland) her. Über eine Schlauchverbindung wurde nun mittels einer elektrischen Pumpe (Minipuls 2; Gilson, Frankreich) ein leichter Überdruck innerhalb der Patch-Pipette erzeugt, um die Anlagerung von Fremdkörpern an die Pipettenspitze zu verhindern. Die eingespannte Patch-Pipette wurde nun unter optischer Kontrolle vorsichtig in die Badlösung eingetaucht und durch den Mikromanipulator dicht über der zu messenden Zelle positioniert, um sie anschließend langsam auf die Zelloberfläche abzusenken. Nach Ablassen des Überdrucks und durch zusätzliches Anlegen von wenigen mmHg Unterdruck erfolgte die Herstellung eines Kontaktes der Pipettenspitze mit der Zellmembran, die sogenannte Cell-Attached-Konfiguration (engl. *to attach* – anheften, anschließen). Der Kontakt der Pipette mit der Zellmembran bildet zwischen dem Inneren der Pipette und der Badlösung im Idealfall einen elektrischen Widerstand von bis zu hundert Gigaohm (G $\Omega$ ), auch Gigaseal (engl. *to seal* – versiegeln) genannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur Messungen im Gigasealbereich ( $> 1$  G $\Omega$ ) durchgeführt, da ein zu geringer Abdichtwiderstand ( $< 1$  G $\Omega$ ) zu Leckströmen und damit verbunden, zu einer Verfälschung der Messwerte geführt hätte. Um von der Cell-Attached-Konfiguration in die Whole-Cell-Konfiguration zu gelangen, wurde der Membranabschnitt unter der Öffnung der

Pipettenspitze durch Applikation eines kurzen elektrischen Pulses geöffnet, wobei darauf geachtet wurde, dass der Gigaseal intakt blieb. Durch die Perforation der Membran wurde eine elektrisch leitende Verbindung zwischen dem Zytoplasma und der Pipettenlösung geschaffen, wodurch eine elektrische Ableitung der gesamten Zellmembran ermöglicht wurde. Durch das deutlich größere Volumen der Pipettenlösung im Verhältnis zum Volumen des Zytoplasmas ist die ionale Zusammensetzung des Zytoplasmas mit der, der Pipettenlösung weitgehend identisch. Dies ermöglicht auch die Applikation von intrazellulär wirksamen Substanzen über die Patch-Pipette (z.B. ADPR).

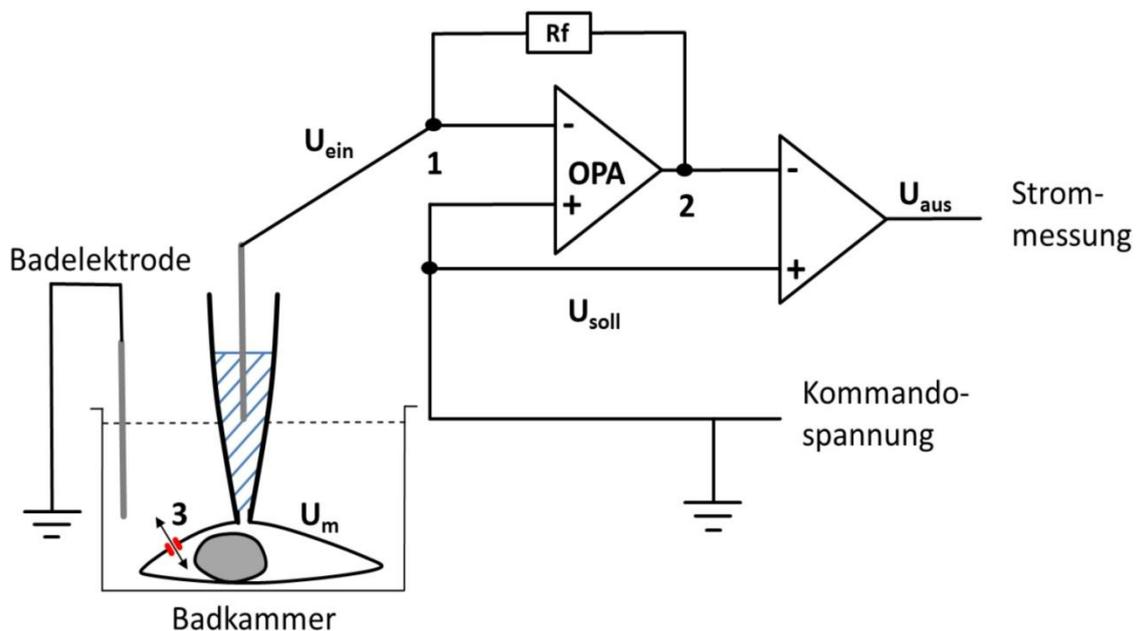


**Abb. 6:** Schematische Darstellung der Cell-Attached- und der Whole-Cell-Konfiguration

Die Patch-Clamp-Technik stellt ein spezielles Voltage-Clamp-Verfahren dar, wobei mittels eines sogenannten Patch-Clamp-Verstärkers das Membranpotential ( $U_m$ ) auf das gewünschte Potential ( $U_{soll}$ ) geklemmt wird (Abb.7). In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten wurde das Haltepotential  $U_{soll}$  vor dem Übergang von der Cell-Attached- zur Whole-Cell-Konfiguration auf  $-60$  mV justiert. Während eines Experiments erfolgten gezielte Änderungen der Sollspannung mittels sogenannter Pulsprotokolle (s. Kap. 3.2.2.10 / 3.2.2.11).

### 3.2.2.3 Funktionsweise eines Patch-Clamp-Verstärkers

Der Operationsverstärker (OPA) stellt ein zentrales Element eines Patch-Clamp-Verstärkers dar. Differenzen zwischen  $U_{\text{ein}}$  und  $U_{\text{soll}}$ , z.B. eine Aktivierung von Ionenkanälen, wie in Abb. 7 unter Punkt 3 schematisch dargestellt, bewirken eine Potentialdifferenz zwischen gemessenem Potential und vorgegebenem Haltepotential. Die daraus resultierende Potentialdifferenz zwischen den Punkten 1 und 2 führt zu einem Stromfluss (Kompensationsstrom) über den Rückkopplungswiderstand ( $R_f$ ) und über die Patch-Pipette in die Zelle. Der Kompensationsstrom gleicht die akuten Änderungen des Membranpotentials aus und bewirkt letztendlich, dass die Zelle weiterhin auf der Sollspannung geklemmt bleibt. Der Kompensationsstrom entspricht dabei dem ursprünglichen durch die Ionenkanäle geflossenen Strom nur mit umgekehrten Vorzeichen (Numberger & Draguhn, 1996).



**Abb. 7:** Schematischer Aufbau eines Patch-Clamp Experiments in der Whole-Cell-Konfiguration. Der Patch-Clamp-Verstärker ist in einem vereinfachten Schaltbild dargestellt. (OPA) Operationsverstärker, ( $R_f$ ) Rückkopplungswiderstand, ( $U_{\text{soll}}$ ) Sollspannung, ( $U_{\text{ein}}$ ) Pipettenpotential, ( $U_{\text{aus}}$ ) Ausgangsspannung, ( $U_m$ ) Membranpotential. Die Ausgangsspannung ist proportional zum Strom durch die Zellmembran (vgl. Numberger & Draguhn, 1996).

### 3.2.2.4 Versuchsaufbau der elektrophysiologischen Untersuchung von TRPM8/TRPM2

Die in dieser Arbeit beschriebenen Patch-Clamp-Experimente wurden an einem Messstand durchgeführt, der sich zur Abschirmung vor äußeren elektrischen Feldern in einem Faraday-Käfig befindet. Zusätzlich sind alle leitenden Teile des Versuchsaufbaus zur Minimierung von

elektrischen Störeinflüssen geerdet. Um den Einfluss von Erschütterungen zu minimieren, ist der Versuchsaufbau auf einem schwingungsgedämpften Tisch, bestehend aus einer 10 cm dicken, Luftdruck- gefederten Steinplatte auf einem vierbeinigen Stahlgestell montiert. Der Versuchsaufbau innerhalb des Faraday-Käfigs besteht aus einem inversen Mikroskop (Zeiss, Deutschland), zwei Mikromanipulatoren (Luigs & Neumann, Deutschland) an denen die Patch-Pipette samt Vorverstärker und ein Perfusionssystem befestigt sind sowie einer Absaugvorrichtung (Rollerpumpe, Parmacia Biotech, Schweiz) für die Badkammer. Sowohl das Perfusionssystem als auch der Objektisch des Mikroskops können separat gekühlt oder erwärmt werden. Dies geschieht über ein mit Flüssigkeit gefülltes Schlauchsystem welches mit einem außerhalb des Faraday-Käfigs stehenden Bad-Umwälz-Thermostaten (RC6, Lauda, Deutschland) verbunden ist. Für Experimente, in denen eine rasche Absenkung der Temperatur erzielt werden musste, wurde ein weiteres, in einem mit Eiswasser gefülltem Gefäß befindliches, manuelles Perfusionssystem im Messstand verwendet. Zusätzlich zum Bad-Umwälz-Thermostaten befinden sich die Steuereinheit der Mikromanipulatoren (Luigs & Neumann, Deutschland), der Patch-Clamp-Verstärker (EPC9, HEKA Elektronik, Deutschland), der Computer sowie die Rollerpumpe zur Druckregulierung innerhalb der Patch-Pipette außerhalb des Faraday-Käfigs.

### **3.2.2.5. Vorbereitung der Patch-Clamp-Messungen von TRPM8 und TRPM2**

Alle Patch-Clamp-Messungen von TRPM2 und TRPM8 exprimierenden Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur mit Standardbadpuffer (Bp1) (s. Kap. 3.1.11.4) als extrazelluläre Lösung durchgeführt. Als Pipetten-Lösung wurden für alle TRPM8-Messungen P11\* und für die TRPM2-Messungen P11 oder P11\* (s. Kap. 3.1.11.4) verwendet. Bei den TRPM2-Messungen erfolgte die Wahl der Pipetten-Lösung in Abhängig von der Art der Stimulation. Im Falle von intrazellulärer Applikation von ADPR über die Pipetten-Lösung wurde der calciumfreie Puffer P11 verwendet. Der calciumhaltige Puffer P11\* wurde dagegen in Experimenten mit extrazellulärer Stimulation durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> angewandt. Nach der Entnahme aus dem Wachstumsmedium und vor Beginn der Messungen von TRPM2 und TRPM8 erfolgte ein kurzes Schwenken der mit tranfizierten HEK-293-Zellen bewachsenen Glasplättchen in auf Raumtemperatur vorgewärmten Bp1. Anschließend wurden diese zunächst in die Badkammer eingespannt und zügig mit 1 ml Bp1 (Raumtemperatur) bedeckt sowie im weiteren Verlauf die befüllte Badkammer in den Objektisch der Patch-Clamp-Messapparatur integriert.

### **3.2.2.6 Durchführung der Patch-Clamp-Messungen von TRPM8 (Menthol- und Kältesensitivität)**

Zu Beginn einer Patch-Clamp-Messung wurde ca. 10 – 15 Sekunden nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration eine Spannungsrampe (SR) (s. Kap. 3.2.2.10 / Abb. 8) zur Bestimmung der Stromspannungsbeziehung unter Ausgangsbedingungen (Raumtemperatur, Standardbadpuffer Bp1 ohne Agonisten bzw. Antagonisten) gemessen. Zusätzlich diente diese erste Messung der Abschätzung der Sealstabilität und der Expressionseffizienz.

Im Anschluss an diese erste Messung erfolgte zur Bestimmung der Mentholsensitivität eine extrazelluläre Applikation mit Bp1 mit einer Menthol-Konzentration von 100  $\mu$ M über ein Perfusionssystem. Die Messung des Menthol-induzierten Einwärts-Stromes fand bei einem Haltepotential von -60 mV statt. Im Maximum des Einwärts-Stromes wurde zur Abschätzung der mentholbedingten Veränderung der Stromspannungsbeziehung ein SSP1 (s. Kap. 3.2.2.11 / Abb. 9) aufgezeichnet. Anschließend erfolgte eine Inhibierung der Einwärts-Ionenkanalströme durch einen Badtausch mit Bp2N (s. Kap. 3.1.11.4). Bp2N enthält anstelle von NaCl, N-Methyl-D-glucamin (NMDG), welches aufgrund seiner Molekülgröße nicht durch die Pore von TRPM8 gelangen kann. Messungen, bei denen unter Bp2N dennoch Einwärts-Ströme über ein geringes Maß hinaus stattfanden, wurden nicht ausgewertet, da dies ein Hinweis auf eine beschädigte Zellmembran bzw. unspezifische Leckströme darstellt.

Bei den Messungen zur Untersuchung der Kältesensitivität wurde der Bp1 innerhalb der Messkammer nach der initialen Spannungsrampe über ein Perfusionssystem durch auf ca. 0 – 5°C gekühlten Bp1 ausgetauscht. Durch diese Perfusion mit gekühltem Bp1 konnte die Temperatur innerhalb der Badkammer auf ca. 10°C eingestellt werden. Die Messungen wurden, wie zuvor für die Menthol-induzierte Aktivierung beschrieben, durchgeführt, (Haltepotential -60 mV, SSP1 im Aktivierungsmaximum) gefolgt von einem anschließenden Block der Ionenkanal-Einwärts-Ströme durch einen Badtausch mit Bp2N (Raumtemperatur).

### **3.2.2.7 Durchführung der Patch-Clamp-Messungen von TRPM8 (Spannungssensitivität)**

Die Messungen zur Untersuchung der Spannungssensitivität von TRPM8 erfolgten bei einer Badtemperatur von ca. 30°C und somit oberhalb der temperaturbedingten Aktivierungsschwelle (26°C) von TRPM8. Ca. 10 – 15 Sekunden nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration wurde ein initiales SSP1 zur Bestimmung der Stromspannungsbeziehung unter Ausgangsbedingungen (Badtemperatur 30°C, Standardbadpuffer BP1) gemessen. Kurz nach dem initialen SSP1 fand die Einstellung der Menthol-Konzentration innerhalb der Badlösung

auf 200  $\mu\text{M}$  statt (Applikation von 1  $\mu\text{l}$  200 mM Menthol direkt in die Badlösung). Während der Menthol-induzierten Aktivierung wurden anschließend mehrere SSP2 (s. Kap. 3.2.2.11 / Abb. 10) zur Bestimmung der maximalen Offenwahrscheinlichkeit (starke Depolarisation in Kombination mit einer hohen Menthol-Konzentration => maximale Aktivierung des Kanals) durchgeführt (Voets et al., 2007).

### **3.2.2.8 Durchführung der Patch-Clamp-Messungen von TRPM2**

Für die elektrophysiologischen Messungen von mit TRPM2 tranfizierten HEK-293-Zellen wurden für die Aktivierung der Ionenkanäle zwei unterschiedliche Methoden verwendet.

Im ersten Verfahren wurde eine mit 300 – 600  $\mu\text{M}$  ADPR versetzte calciumfreie Pipettenlösung (P11) verwendet, um nach dem Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration eine intrazelluläre ADPR-Konzentration von ca. 300 – 600  $\mu\text{M}$  einzustellen. Diese intrazelluläre ADPR-Konzentration führt innerhalb von 30 s – 60 s zur Aktivierung der TRPM2-Kanäle, was sich bei einem angelegten Haltepotential von -60 mV durch prominente Einwärtsströme manifestiert (unspezifischer Kationeneinstrom, u.a.  $\text{Ca}^{2+}$ ). Da Calcium die Aktivierbarkeit von TRPM2 durch ADPR verstärkt, werden vermehrt TRPM2-Kanäle geöffnet, was zu einem deutlich schnelleren Anstieg der Einwärts-Ströme führt. In den Experimenten wurde die Unversehrtheit der Zellmembran während der steil ansteigenden Einwärts-Ströme durch mehrfaches, kurz aufeinanderfolgendes Inhibieren mit NMDG (Badtausch mit BpN2 gefolgt von einem Badtausch mit Bp1) überwacht. Die erste Inhibition der Einwärts-Ströme durch NMDG erfolgte bei Stromamplituden zwischen 500 pA – 1 nA.

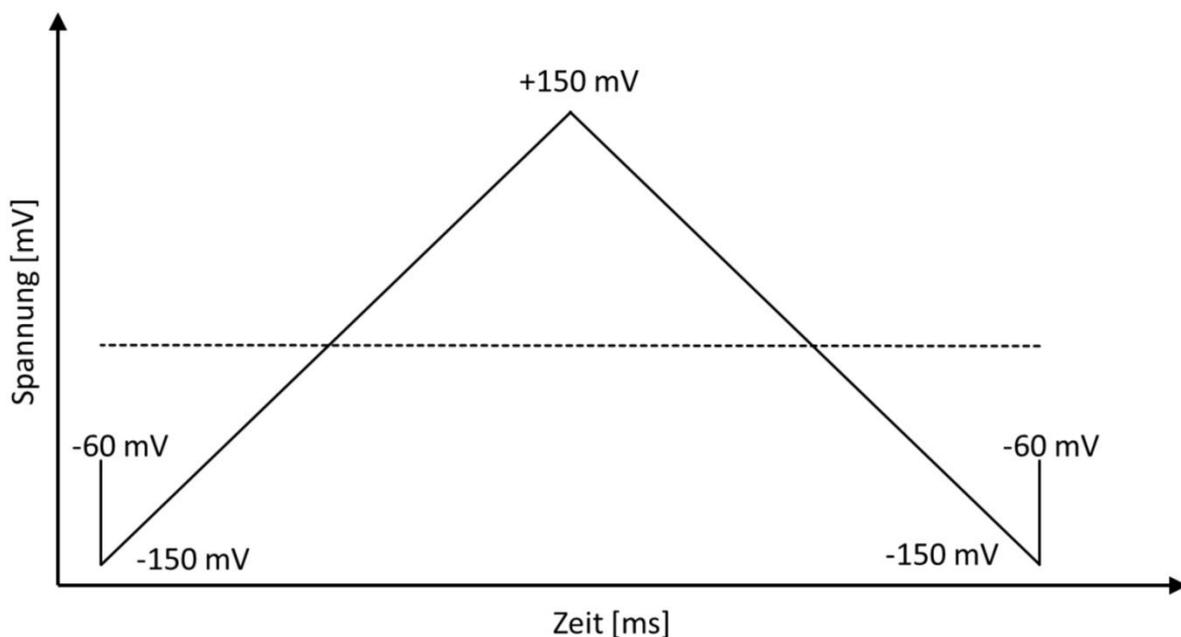
In einem alternativen Verfahren zur Aktivierung von TRPM2-Kanälen wurde die Pipettenlösung P11\* ohne ADPR verwendet. Nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration erfolgte die Initiierung der Aktivierung von TRPM2 durch oxidativen Stress (extrazelluläre Applikation von 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Dafür wurden 1  $\mu\text{l}$  einer 10 M  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung in die Badkammerlösung (Volumen 1 ml Bp1) pipettiert. Wie im ersten Verfahren beschrieben, wurden auch bei dieser Methode die sich selbst verstärkenden Einwärts-Ströme ab Stromamplituden von 500 pA – 1 nA in kurzen Abfolgen mit NMDG inhibiert.

### 3.2.2.9 Patch-Pipetten

Patch-Clamp-Experimente wurden mit Pipetten aus Borosilikatglas (Hilgenberg, Deutschland) durchgeführt (Länge 75 mm, Außendurchmesser 1,8 mm, Wandstärke 0,36 mm). Die Spitzen der Patch-Pipetten wurden mit einem DMZ-Universal-Puller (Zeitz-Instrumente GmbH, Deutschland) in zwei Schritten auf einen Innerdurchmesser von ca. 1  $\mu\text{m}$  gezogen und hitzepoliert. Bei Verwendung von P11\* als Pipettenlösung weisen die Patch-Pipetten einen Widerstand von  $3 \text{ M}\Omega \pm 0,5 \text{ M}\Omega$  auf.

### 3.2.2.10 Spannungsrampe

Der Begriff „Spannungsrampe“ beschreibt in der Elektrophysiologie eine, nach einem vorgegebenen Programm gesteuerte, kontinuierliche Veränderung des Haltepotentials, während eines Patch-Clamp-Experiments. Die in dieser Arbeit verwendete Spannungsrampe startet, ausgehend vom Standardhaltepotential von -60 mV, bei einem Potential von -150 mV. Über einen Zeitraum von 400 ms wird nun das Potential von -150 mV kontinuierlich auf +150 mV erhöht und wieder auf den Ausgangswert von -150 mV abgesenkt. Im Anschluss an die Spannungsrampe wird die Zelle wieder auf das Standardhaltepotential von -60 mV geklemmt. Angewendet wurde dieses Spannungsrampenprotokoll zur ersten Abschätzung einer Strom-Spannungsbeziehung der unterschiedlichen TRPM8 Mutanten.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Spannungsrampenprotokolles. Die gestrichelte Linie stellt ein Haltepotential bei 0 mV dar. Der Messbereich der Spannungsrampe reicht von -150 mV bis +150 mV über einen Zeitraum von 400 ms.

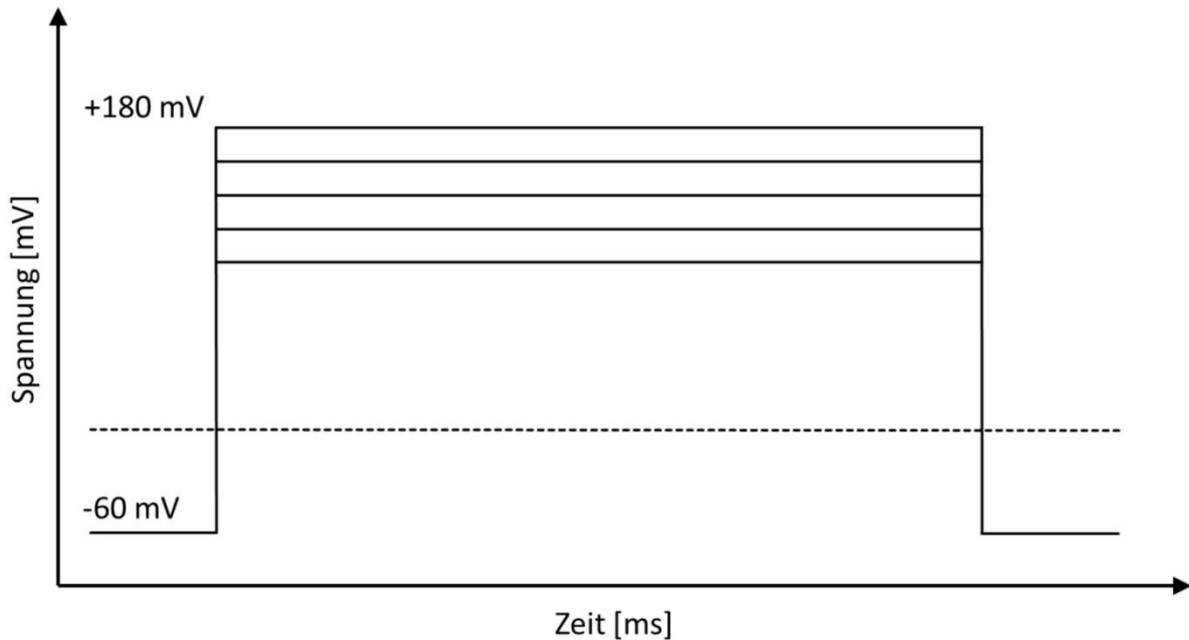
### 3.2.2.11 Spannungsstufenprotokoll

Ein Spannungsstufenprotokoll (SSP) ist, wie eine Spannungsrampe, eine nach einem vorgegebenen Programm gesteuerte Veränderung des Haltepotentials mit dem Unterschied, dass die Änderungen nicht kontinuierlich, sondern in zeitlich definierten Spannungssprüngen ( $\Delta V$ ) vollzogen werden. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Spannungsstufenprotokolle verwendet. In beiden Protokollen ist sowohl die Dauer der einzelnen Spannungsstufen mit 50 ms als auch die Amplitudendifferenz der aufeinanderfolgenden Spannungsstufen mit  $\Delta V = 20 \text{ mV}$  identisch. Das Spannungsstufenprotokoll 1 (SSP1) startet mit einem 10 ms dauernden Haltepotential von  $-60 \text{ mV}$ , gefolgt von der ersten Stufe ebenfalls bei  $-60 \text{ mV}$ . Ausgehend von der ersten Spannungsstufe folgen 14 weitere bis zu einem Haltepotential von  $+220 \text{ mV}$ . Jede dieser 14 Spannungsstufen beinhaltet einen Spannungssprung ausgehend von  $-60 \text{ mV}$  auf einen zur vorherigen Spannungsstufe um  $20 \text{ mV}$  gesteigerten Wert. Nach den insgesamt 15 Spannungsstufen von  $-60 \text{ mV}$  bis  $+220 \text{ mV}$  wird das Haltepotential wieder für eine Dauer von  $10 \text{ ms}$  auf den Ausgangswert von  $-60 \text{ mV}$  geklemmt.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung des Spannungsstufenprotokolls 1 (SSP1). Die Amplitudendifferenz zwischen den einzelnen  $50 \text{ ms}$  dauernden Spannungsstufen beträgt  $20 \text{ mV}$ . Die aufeinanderfolgenden Spannungsstufen, beginnend bei  $-60 \text{ mV}$  bis  $+220 \text{ mV}$ , sind der Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit halber übereinander dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt ein Haltepotential bei  $0 \text{ mV}$  dar.

Das Spannungsstufenprotokoll 2 (SSP2) startet und endet, wie das SSP1, bei einem Haltepotential von  $-60$  mV. Dazwischenliegend folgen fünf wie im SSP1 durchgeführte Spannungsstufen bis zu einem Haltepotential von  $+180$  mV, beginnend mit einer Spannungsstufe bei einem Haltepotential von  $+100$  mV. Die SSPs dienen der genauen Analyse der Strom-Spannungsbeziehungen der einzelnen TRPM8-Mutanten (Voets et al., 2007).



**Abb. 10:** Schematische Darstellung des Spannungsstufenprotokolls 2 (SSP2). Der Spannungsanstieg, der aufeinanderfolgenden,  $50$  ms dauernden, Spannungsstufen beträgt  $20$  mV. Die nacheinander ablaufenden Spannungsstufen von  $+100$  mV bis  $+180$  mV sind der Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit halber übereinander dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt ein Haltepotential bei  $0$  mV dar.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR)

Die im Jahr 1983 von K. Mullis entwickelte PCR-Technik ermöglicht *in vitro* eine exponentielle Amplifikation kurzer, spezifischer DNA-Sequenzen von maximal 20 – 40 kbp Länge. Das Prinzip dieser Methode besteht aus drei zyklisch ablaufenden Teilschritten, welche je nach Protokoll 20 bis 50 mal wiederholt werden (Mullis et al., 1986).

Der erste Teilschritt umfasst die Denaturierung der doppelsträngigen Matrizen-DNA durch Erhitzen auf 95°C, wobei dieser Schritt im ersten Zyklus deutlich verlängert ist, um sicherzustellen, dass neben der Template-DNA auch die, dem PCR-Ansatz zugegebenen, künstlich hergestellten Primer vollständig denaturieren.

Im zweiten, ca. 30 s – 60 s dauernden Schritt, binden die Primer an die komplementären Einzelstränge der zu amplifizierenden DNA (engl. *primer-annealing*). Dies geschieht bei Temperaturen von 55- 65°C, abhängig von der Länge und dem G-C-Gehalt der Primer.

Für den dritten und letzten Schritt eines Zyklus der DNA-Amplifikation enthält ein PCR-Ansatz neben den Primern noch ein Gemisch aus den vier verschiedenen Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*). Im Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerase (68 – 72°C) kopiert diese ausgehend vom 3'-Ende des hybridisierten Primers die einzelsträngige Matrizen-DNA in 5' -> 3' Richtung (Saiki et al., 1988).

**Tabelle 1:** Standardprotokoll für eine PCR

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Inkubationszeit	Ereignis
1x	95°C	5 min	Denaturierung der Primer sowie der Template-DNA
20x - 50x	Primer-T <sub>m</sub> 55 – 65°C	30 s	Primerhybridisierung
20x - 50x	68 – 72°C abhängig von der DNA- Polymerase	ca. 1 min / 1000bp	Amplifikation der Template-DNA
20x - 50x	95°C	1 min	Erneute Denaturierung

### 3.3.2 Überprüfung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

DNA-Moleküle besitzen eine negative Nettoladung und wandern daher im elektrischen Feld zur Anode. Diese Eigenschaft wird in der Gelelektrophorese ausgenutzt. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung bewegen sich die DNA-Moleküle entlang des elektrischen Feldes durch ein vernetztes Polymer aus Agarose. Da große DNA-Moleküle in diesem Polymer langsamer migrieren als kleine, können DNA-Moleküle mittels Gelelektrophorese in Abhängigkeit von ihrer Größe und Form in Laufrichtung der angelegten Spannung aufgetrennt werden.

Für die in dieser Arbeit durchgeführte Detektion von PCR-Produkten wurden 0,8 – 1% Agarosegele verwendet. Dafür wurden 0,4 – 0,5 g Agarose mit 50 ml 1x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (1xTAE-Puffer, 40 mM Tris-Base, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA pH 8,0) vermischt, in der Mikrowelle durch Erhitzen gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50°C mit 2,5 µl Ethidium-Bromid-Lösung (5 µg/ml) versetzt. Nach Gießen und Aushärten des Gels erfolgte die Beladung der Taschen mit jeweils 15 µl eines, mit Probenpuffer (6x Gel Loading Dye, BioLabs, USA) versetzten, Reaktionsansatzes (12,5 µl Reaktionsansatz + 2,5 µl 6x Probenpuffer). Neben den Reaktionsansätzen wurden einer Tasche zusätzlich 15 µl eines DNA-Größenmarkers zugefügt. Der anschließende Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 70 V über einen Zeit-

raum von ca. 60 min. Die Auftrennung der Proben im Gel konnte dann unter UV-Licht analysiert und mittels Geldoc (Gel Hood, Intas, Deutschland) dokumentiert werden.

### **3.3.3 DNA-Sequenzierung**

Alle für diese Arbeit durchgeführten DNA-Sequenzierungen wurden kommerziell von der deutschen Firma MWG-Biotech durchgeführt.

### **3.3.4 Restriktionsverdau**

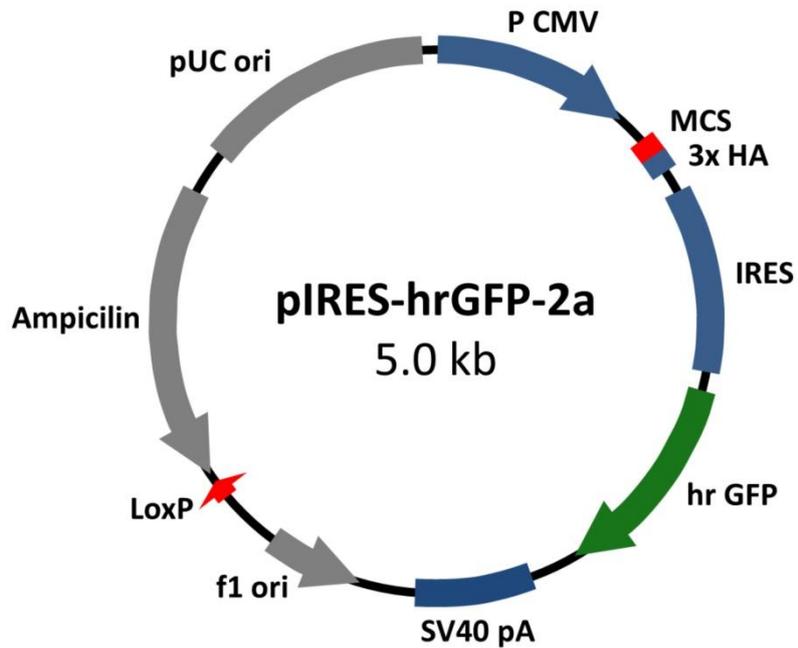
Restriktionsendonukleasen (REN) sind eine Gruppe bakterieller Enzyme, die DNA-Basensequenzen spezifisch erkennen und dort gezielt das Phosphodiester-Rückgrat des DNA-Doppelstranges zerschneiden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme zur Spaltung methylierter und hemimethylierter Template-DNA in der PCR basierten *in vitro* Mutagenese (s. Kap. 3.3.11) sowie zur Klonierung von cDNA in die entsprechenden Expressions-Vektoren eingesetzt (s. Kap. 3.3.5).

### **3.3.5 Klonierung**

Die Klonierung ist ein zellbiologisches Verfahren zur exakten Vervielfältigung von DNA. Bei dieser Methode wird das zu untersuchende Gen in einen Plasmid-Vektor integriert, welcher dann mittels Transformation (s. Kap. 3.3.7) in kompetente Bakterienzellen eingebracht und dort durch Replikation *in vivo* vervielfältigt wird. Mittels Selektion über Antibiotika enthalten die entstehenden Bakterienpopulationen daher alle das inserierte Plasmid (Klon).

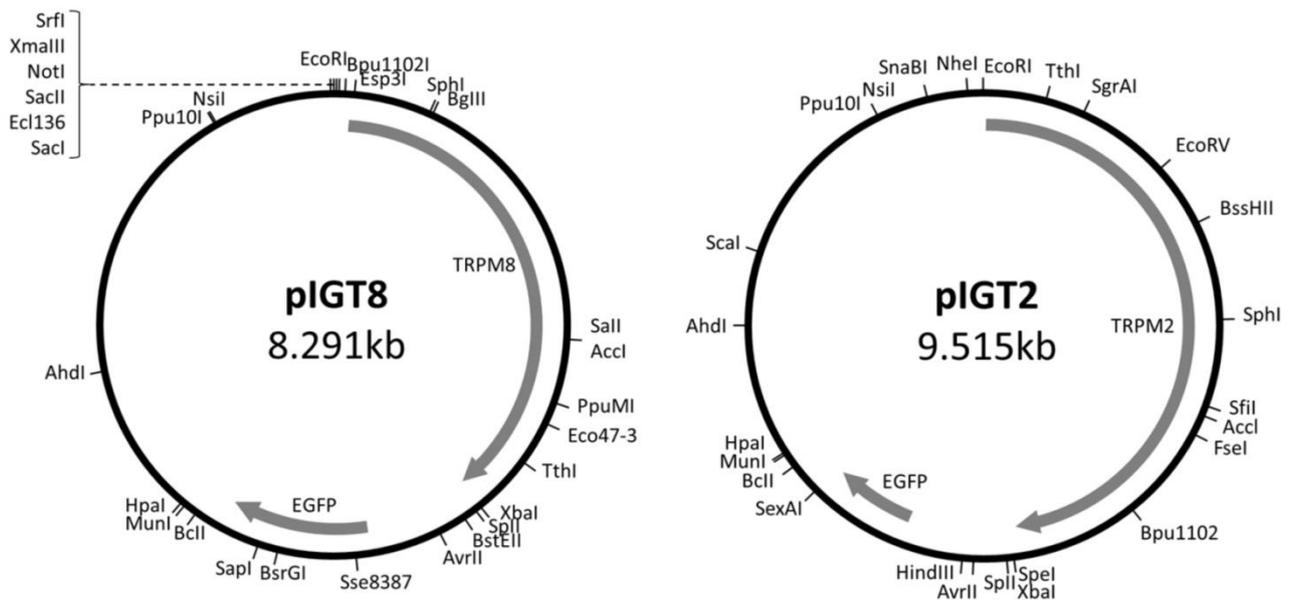
Für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen wurde ausschließlich eine veränderte Version des kommerziellen Plasmidvektors pIRES-hrGFP-2a (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet (innerhalb der multiplen Klonierungsstelle wurde die XhoI-Erkennungssequenz in eine XbaI-Erkennungssequenz mutiert) (s. Abb. 11).



**Abb. 11:** Schematische Plasmid-Karte von pIRES-hrGFP-2a

DNA-Elemente	Nukleotid Position
CMV Promotor	1 – 602
T3 Primer-Bindestelle [5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3']	620 – 639
Multiple Klonierungsstelle (engl. multiple cloning site, MCS)	651 – 715
Stopcodon im Leseraster des HA-Tags	677 – 679
3 x HA-Tag	716 – 796
Primer-Bindestelle [5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3']	779 – 798
interne ribosomale Eintrittsstelle (engl. internal ribosomal entry site, IRES)	832 – 1406
hr GFP ORF	1416 – 2132
T7 Primer-Bindestelle [5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3']	2164 – 2185
SV40 PolyA Signal	2197 – 2580
f1 Startpunkt der Einzelstrang-DNA Replikation	2718 – 3024
LoxP Sequenz	3187 – 3220
Ampicilin Resistenz ORF	3265 – 4122
pUC Startpunkt der Replikation	4269 – 4936

Die restriktionsenzymatische Spaltung zur Integration sowohl der cDNA von TRPM8 als auch von TRPM2 in die multiple Klonierungsstelle (MCS) erfolgte durch die Restriktionsenzyme EcoRI und XbaI (s. Abb. 12). Hierfür wurden sowohl der Vektor als auch die cDNA einem Restriktionsverdau mit EcoRI und XbaI unterzogen, um zueinander komplementäre Enden zu erzeugen.



**Abb. 12:** Plasmid-Karten des pIRES-hrGFP-2a mit integrierter cDNA von hTRPM8 (pIGT8) und hTRPM2 (pIGT2). Die Integration der cDNA in die multiple Klonierungsstelle des Vektors erfolgte durch einen doppelten Restriktionsverdau mit EcoRI und XbaI und anschließender Ligation.

### 3.3.6 Ligation

Bei einer Ligrationsreaktion werden aufgereinigte DNA-Fragmente mit linearisierten Vektoren über kompatible Enden hybridisiert und durch das Enzym T4-DNA-Ligase kovalent miteinander verbunden. Die T4-DNA-Ligase katalysiert dabei die Ausbildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen dem freien 3'-Hydroxy-Ende und dem freien 5'-Phosphat-Ende der DNA-Segmente.

Alle Ligationen in dieser Arbeit wurden nach Herstellerangaben mit dem Quick Ligation Kit der Firma New England Biolabs durchgeführt. Für einen Ligrationsansatz wurden 10 µl 2x Quick Ligation Puffer mit 10 µl in TE-Puffer gelöster DNA (Plasmid- / Insert-cDNA; 1/3) sowie 1 µl T4-Ligase für 5 – 12 min bei 25°C im PCR-Gerät (MWG Biotech, Deutschland) inkubiert.

### 3.3.7 Transformation

Der Begriff Transformation stammt aus der Zellbiologie und beinhaltet die Aufnahme von DNA durch prokaryotische Zellen. Dies findet in der Gentechnik häufig Anwendung, um rekombinante DNA nach einer Klonierung (s. Kap. 3.3.5) in einen Vektor in Bakterienzellen zu vervielfältigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Transformationen wie folgt durchgeführt: 50 µl One Shot superkompetente Zellen (Lifetechnologies™, USA) wurden mit 10 – 50 ng rekombinanter Plasmid-DNA vermischt und auf Eis für 30 min inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock durch Inkubation bei 42°C für 45 s und eine anschließende Inkubation auf Eis über einen Zeitraum von 5 – 10 min. Nach der Zugabe von 250 µl S.O.C- Medium (Lifetechnologies™, USA) wurde die Probe im Inkubator bei 37°C für eine Stunde geschüttelt (Infors, Schweiz). Im Folgenden fand eine Ausplattierung von 100 – 300 µl der Zellsuspension auf eine vorgewärmte, mit 100 µg/ml Ampicilin versetzte, LB-Platte statt. Abschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C im Brutschrank (Jouan, Deutschland) über Nacht.

### 3.3.8 Selektion und Kultivierung

Die erste Selektion findet auf einer mit dem Antibiotikum Ampicilin versetzten LB-Platte (LB-Amp-Platte) statt, auf der nur Bakterien wachsen, die das pIRES-hrGFP-2a-Plasmid mit dem entsprechenden Antibiotika-Resistenzgen aufgenommen haben. Da auch Bakterien, die einen leeren Plasmid-Vektor (ohne integrierte cDNA) enthalten, die Ampicilin-Resistenz ausbilden, wurden von mehreren Kolonien Übernachtskulturen angelegt und anschließend auf eine erfolgreiche Insertion der cDNA in den Plasmid-Vektor getestet. Zu diesem Zweck wurden mit sterilen Zahnstochern 4 – 8 Bakterien-Kolonien von der LB-Amp-Platte aufgenommen, in jeweils 5 ml mit 100 µg/ml Ampicilin versetztes 2xYT-Medium überführt und unter Schütteln im Inkubator bei 37°C über Nacht inkubiert. Aus den Übernachtskulturen erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA sowie die Charakterisierung durch einen Restriktionsverdau (s. Kap. 3.3.4) mit anschließender Gelelektrophorese (s. Kap. 3.3.2).

### 3.3.9 Plasmid-Mini-Präparation (Mini-Prep)

Die Plasmid-Mini-Präparation ist eine Methode zur Isolation von Plasmiden aus Bakterien in einem kleinen Maßstab nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim et al., 1979).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mini-Präparationen wurden alle mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurde eine Bakterienkolonie in 5 ml mit Ampicilin versetztem 2xYT-Medium über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation der Kultur bei 6800 x *g* über 15 min erfolgte die Isolierung der Plasmide aus dem Zellpellet nach Herstellerangaben.

### **3.3.10 Plasmid-Maxi-Präparation (Maxi-Prep)**

Größere Mengen endotoxinfreier, hochreiner Plasmid-DNA können, wie bei der Mini-Prep, nach dem Funktionsprinzip der alkalischen Lyse durch Plasmid-Maxi-Präparationen aufgereinigt werden. Die dadurch gewonnene Plasmid-DNA wird, z.B. bei der Transfektion eukariotischer Zellen eingesetzt.

Die für diese Arbeit durchgeführten Plasmid-Präparationen im großen Maßstab wurden mit Hilfe des EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurde zuerst durch Animpfen von 3 ml mit 100 µg/ml Ampicilin versetztem 2xYT-Medium eine Vorkultur angelegt und diese für 5 – 8 Stunden bei 37°C inkubiert. 50 µl der Vorkultur wurden anschließend in 125 ml mit 100 µg/ml Ampicilin versetztem LB-Medium über Nacht bei 37°C inkubiert, gefolgt von einem 60 minütigem Zentrifugationsschritt bei 4°C mit 5000 x *g*. Die Plasmid-Isolierung aus dem Zellpellet fand anschließend nach Herstellerangaben statt.

### **3.3.11 PCR basierte in-vitro-Mutagenese**

Die Mutagenese ist ein Verfahren in dem künstlich DNA-Veränderungen (Austausch, Insertion oder Deletion von Basen) generiert werden. Bei der gezielten Mutagenese (engl. *site directed mutagenesis*) können dabei spezifisch einzelne Basen in der rekombinanten DNA verändert werden.

Um im Rahmen dieser Arbeit die funktionelle Bedeutung einzelner Aminosäurereste innerhalb der Kanalstruktur von TRPM2 und TRPM8 zu untersuchen, wurden durch gezielte Mutagenesen verschiedene Varianten dieser beiden Kanäle erzeugt. Die Mutationen fanden dabei nach Herstellerangaben mit einem PCR basierten *in-vitro*-Mutageneseverfahren (Quickchange II Site Directed Mutagenesis Kits, Stratagene, USA) statt. Zu Beginn dieses Mutageneseverfahrens wurden zunächst zwei zueinander komplementäre, exakt gleichlange Oligonukleotide (Sense und Antisense) (s. Kap. 3.1.7) generiert, welche die geplanten

Basenaustausche enthielten. In der anschließenden PCR (s. Kap. 3.3.1) erfolgte dann die Amplifizierung des das mutierte Zielgen enthaltenden Plasmidvektors pIRES-hrGFP-2a.

PCR Reaktionsansatz (50  $\mu$ l):

- 1  $\mu$ l ds Template-DNA (50 ng)
- 5  $\mu$ l 10x Reaktionspuffer
- 1  $\mu$ l dNTP-Mix
- 1  $\mu$ l Oligonukleotide (125 ng); Sense und Antisense
- 1  $\mu$ l Pfu Turbo Polymerase 2,5 Units

Um die ursprüngliche, nicht mutierte Template-DNA aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde dieser nach der PCR einem Restriktionsverdau (s. Kap. 3.3.4) mit dem Enzym DpnI (1 h bei 37°C) unterzogen, einem Enzym das ausschließlich methylierte DNA schneidet. Da die, in der PCR neu amplifizierten, die Mutation enthaltenden Plasmide im Gegensatz zur Template-DNA keine Methylierungen aufweisen, sind diese von dem Verdau nicht betroffen. Nach dem Restriktionsverdau wurden die amplifizierten Plasmide aufgereinigt, in One Shot superkompetente Zellen transformiert (s. Kap. 3.3.7) und anschließend selektioniert (s. Kap. 3.3.8).

## **3.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.4.1 Zelloberflächenbiotinylierung**

Die Zelloberflächenbiotinylierung diente dem Nachweis des erfolgreichen Transports von TRP-Proteinen in die Zellmembran. Dafür wurde EZ-Link<sup>®</sup> Sulfo-NHS-SS-Biotin, ein nicht membrangängiges Molekül, extrazellulär auf die transfizierten HEK-293-Zellen appliziert, wodurch Zelloberflächenproteine unspezifisch durch Sulfo-NHS-SS-Biotin kovalent gebunden und somit mit Biotin markiert werden. Da das Biotin nicht die Zellmembran von intakten Zellen passieren kann, geht es ausschließlich kovalente Bindungen mit extrazellulär lokalisierten Proteindomänen ein. Durch die starke, spezifische Wechselwirkung zwischen Biotin und Avidin werden im Anschluss an die Biotinylierung die Biotin-gebundenen Proteine über mit NeutrAvidin<sup>®</sup> konjugierte Agarose-Beads aufgereinigt.

Die Zelloberflächenbiotinylierung erfolgte mit dem Pierce<sup>®</sup> Cell Surface Protein Isolation-Kit der Firma ThermoScientific nach Herstellerangaben. Dafür wurden zunächst die

transfizierten und zu 90 – 95% konfluenten HEK-293-Zellen in einer 100 x 20 mm Zellkulturschale zweimal mit 8 ml eiskaltem 1 x PBS gewaschen und nach Zugabe von 10 ml Biotin-Lösung (EZ-Link® Sulfo-NHS-SS-Biotin in 1 x PBS) für 30 min bei 4°C geschwenkt. Um zu verhindern, dass es bei der Zell-Lyse zur Biotinylierung von intrazellulären Proteinen kommt, wurde das überschüssige Biotin durch Zugabe von 500 µl Quenching-Lösung gebunden. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturschale gelöst, in 10 ml TBS aufgenommen und bei 500 x *g* für 3 min bei 4 °C zentrifugiert, gefolgt von einem Waschschrift bei dem das Pellet in 5 ml 1 x TBS resuspendiert wurde. Daraufhin folgte ein wie zuvor beschriebener Zentrifugationsschritt. Für die folgende Lyse der Zellen mittels Ultraschall (Branson Sonifier 150, Heinemann, Deutschland) wurde das Pellet in 500 µl Lysepuffergemisch (Lysepuffer, 1 : 100 Protease-Inhibitor [PI], 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid [PMSF]) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Um eine optimale Zell-Lyse zu erreichen, wurde die Probe für 30 min alle 5 min kurz gevortext (Reax 2000, Heidolph, Deutschland) sowie sonifiziert. Im Anschluss daran folgte die Abzentrifugierung des Lysats mit 10.000 x *g* für 2 min bei 4°C. Nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung (s. Kap. 3.4.3) wurde der Überstand auf die zuvor äquilibrierte Säule (500 µl NeutrAvidin-Agarosebeads wurden auf die Säule aufgetragen → Zentrifugation 1 min bei 1.000 x *g* → 3 mal 500 µl Waschpuffer → Zentrifugation 1 min bei 1.000 x *g* → Durchfluss wurde jeweils verworfen) aufgetragen und für 60 min bei Raumtemperatur unter ständigem Mischen inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min bei 1.000 x *g* und dreimaligem Waschen (500 µl Waschpuffer, 1 : 100 Protease-Inhibitor, 1mM PMSF → Zentrifugation 1 min bei 1.000 x *g*) wurden die Beads mit 500 µl Sample-Puffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, DTT 50 mM, 1% SDS; 10% Glycerol) versetzt. Es folgte eine 60 minütige Inkubationszeit unter ständigem Mischen bei Raumtemperatur, in der die gebundenen Proteine von den Beads eluiert wurden. Das nach einem letzten Zentrifugationsschritt (2 min bei 1.000 x *g*) gewonnene Eluat wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Kap. 3.4.4) aufgetrennt. Im Western Blot (s. Kap. 3.4.5) erfolgte anschließend die Überprüfung der Oberflächenexpression der zu untersuchenden Proteine mit einer spezifischen Immunfärbungen gegen TRPM8 bzw. TRPM2 (s. Kap. 3.4.6).

### 3.4.2 Zentrifugationsmethode

Wie die Methode der Zelloberflächenbiotinylierung, dient auch die etablierte und kostengünstigere Zentrifugationsmethode dem Nachweis der Oberflächenexpression von TRP-Kanälen. Hierbei werden mittels differentieller Zentrifugation in drei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten ( $4.000 \times g$ ,  $20.000 \times g$ ,  $100.000 \times g$ ) unterschiedliche Membranfraktionen gewonnen. Bei einer Zentrifugation bei  $4.000 \times g$  über 15 min werden Zellkerne, Mitochondrien und größere Zellfragmente aus dem Zell-Lysat weitgehend entfernt. Im anschließenden Zentrifugationsschritt bei  $20.000 \times g$  über 20 min wird die für die Untersuchung der Oberflächenexpression wichtige Zellmembranfraktion angereichert. Der letzte Schritt dieser differentiellen Zentrifugation bei  $100.000 \times g$  über eine Stunde dient der Absonderung der Organellenmembranfraktion (Vriens et al., 2005).

Die Zentrifugationsmethode wurde, wie bei Vriens *et al.* (2005) beschrieben, durchgeführt. Die in einer  $100 \times 20$  mm Zellkulturschale transfizierten und zu 90 – 95% Konfluenz gewachsenen HEK-293-Zellen wurden zunächst mit 8 ml eiskalter 1 x PBS-Lösung gewaschen und anschließend mit 3 ml kaltem Lyse-Puffer (50 mM Tris, pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA und 1 mM PMSF) versetzt. Es folgte das Ablösen der Zellen von der Kulturschale mit einem Zellschaber und anschließend die Überführung der Zellsuspension in ein 15 ml Falcontube. Nach 30 minütiger Inkubation bei  $4^\circ C$  unter ständigem Mischen wurde die Probe dreimal gefroren und wieder aufgetaut. Durch das Einfrieren der Probe kommt es in den Zellen zur Kristallbildung und damit zur Schädigung der Zellmembran. Die Zellsuspension wurde im weiteren Verlauf noch dreimal mit einer Spritze durch eine dünne Nadel (0,4 mm  $\emptyset$ ) aufgezogen und unter geringer Schaumbildung zurück ins Reaktionsgefäß gespritzt. Die auftretenden Scherkräfte während der Passage durch die Nadel führen dabei in Verbindung mit der vorherigen Beschädigung der Zellmembranen während des Einfrierens zur Zell-Lyse. Im Anschluss an diesen Schritt werden die größeren Zellbestandteile, wie Zellkerne und Mitochondrien, abzentrifugiert ( $4.000 \times g$  über 15 min bei  $4^\circ C$ ). Für den zweiten Schritt der differentiellen Zentrifugation, die Gewinnung der Zellmembranfraktion, wurde der Überstand bei  $4^\circ C$  mit  $20.000 \times g$  für 20 min in der Ultrazentrifuge (Beckman, Deutschland) zentrifugiert, gefolgt von der Resuspension des Pellets in 250  $\mu$ l kaltem Solubilisierungspuffer (1 x PBS versetzt mit 0,2% SDS, 1 mM PMSF und 1 : 100 PI). Der anfallende Überstand wurde zur Gewinnung der Organellenmembranfraktion im Anschluss bei  $4^\circ C$  mit  $100.000 \times g$  über eine

Stunde zentrifugiert und das Pellet wie im Schritt zuvor resuspendiert. Nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung (s. Kap. 3.4.3) erfolgte die Auftrennung der Proben mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Kap. 3.4.4) und anschließend die Untersuchung im Western-Blot (s. Kap. 3.4.5) durch Immunfärbungen (s. Kap. 3.4.6).

### **3.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford-Assay)**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Bradford-Assay. Die Grundlage dieser Methode ist die Komplexierung des in dem Assay eingesetzten Coomassie-Farbstoffes (*Coomassie Brilliant Blue G250*) mit den in der Probe enthaltenen Proteinen. Die Komplexierung führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm des ungebundenen Farbstoffs hin zu 595 nm in der komplexierten Form. Durch die Messung der Absorption bei 595 nm kann somit die Proteinkonzentration der Lösung bestimmt werden (Bradford, 1976).

Zu Beginn erfolgte die Erstellung einer Eichgerade durch eine photometrische Kalibrierung (BioPhotometer, Eppendorf, Deutschland) einer BSA- (*bovine serum albumin*) Standardreihe von 0 – 2 mg/ml. Hierfür wurden jeweils 16 µl der verschiedenen Verdünnungen mit 500 µl Bradford-Reagenz (Sigma-Aldrich, Deutschland) gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die jeweilige Absorption bei 595 nm gemessen. Nach anschließender Messung der Probe (16 µl Probe in 500 µl Bradford-Reagenz, 5 min Raumtemperatur) konnte mit Hilfe der Eichgeraden die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden.

### **3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine proteinbiochemische Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse. Vor dem eigentlichen Trennvorgang werden die Proteine durch 15 minütiges Erhitzen bei 65°C in LDS- (Lithiumdodecylsulfat) und  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigem Probenpuffer denaturiert, wobei das  $\beta$ -Mercaptoethanol der Aufspaltung von Disulfidbrücken dient. Das im Probenpuffer enthaltene anionische Detergenz LDS bindet an die denaturierten Proteine, wobei die Eigenladung der Proteine durch die negativen Ladungen des Detergenz überdeckt wird. Zusätzlich wird durch gegenseitige Abstoßung der negativen Ladungen des gebundenen Detergenz eine Linearisierung der denaturierten Proteine herbeigeführt. Diese beiden Effekte ermöglichen

die Auftrennung der Proteine im Gel nach ihrer Kettenlänge (Molekülgröße), welche proportional zur molekularen Masse ist.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten SDS-PAGE wurden die zu untersuchenden Zell-Lysate nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung (s. Kap. 3.4.3) normalisiert, mit LDS-Probenpuffer (NuPAGE®, Lifetechnologies™, USA) versetzt und anschließend für 15 min auf 65°C erhitzt. 40 µl der jeweiligen auf diese Weise behandelten Proben wurden daraufhin auf ein Gradientengel (NuPAGE® Novex®, Lifetechnologies™, 4 – 12% Bis-Tris SDS-PAGE Gel) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte auf Eis in einem vertikalen Gelsystem der Firma Lifetechnologies™ bei 200 V über einen Zeitraum von 90 min unter Verwendung von 1x Mospuffer (2,5 mM Mops, 2,5 mM Tris Base, 0,005% SDS, 0,05 mM EDTA auf 500 ml, pH 7,7) als Laufpuffer.

### 3.4.5 Western-Blot

Ein Western-Blot ist ein spezielles biochemisches Verfahren, in dem Proteine, die zuvor mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, zur weiteren Untersuchung (z.B. durch spezifische Antikörper) aus dem Gel auf eine Trägermembran übertragen werden.

Nach der SDS-PAGE (s. Kap. 3.4.4) wurde auf das Gel eine zuvor durch kurzes Schwenken in Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) der Firma Bio-Rad gelegt und von oben und unten mit jeweils vier Lagen in Transferpuffer (1,25 mM Bicin, 1,25 mM Bis-Tris Base, 0,05 mM EDTA, 1x Puffer, pH 7,2) getränkten Whatmanpapier (Schleicher&Schuell, Deutschland) und jeweils zwei in Transferpuffer getränkten Kunststoffschwämmen (Lifetechnologies™, USA) bedeckt und in eine Western-Blot-Kammer (X Cell II™ Blot Module, Lifetechnologies™, USA) überführt. Beim Zusammenlegen der einzelnen Schichten galt es, darauf zu achten, dass sowohl zwischen Gel und Membran als auch zwischen den einzelnen Lagen Whatmanpapier sowie den Schwämmen keine Luftblasen eingeschlossen werden. Die Western-Blot-Kammer wurde anschließend in eine Blotting-Apparatur (X Cell Sure Lock™, Lifetechnologies™, USA) gespannt und mit Transferpuffer befüllt. Die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran in der Blotting-Apparatur erfolgte auf Eis durch ein zum Gel senkrecht orientiertes, elektrisches Feld bei 30 V über einen Zeitraum von 90 min.

### 3.4.6 Immunodetektion von Proteinen

Der Nachweis spezifischer Proteine auf einer PVDF-Membran (s. Kap. 3.4.5) erfolgte durch indirekte Immunodetektion über einen mit Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) konjugierten Sekundärantikörper der an einen spezifischen, unkonjugierten primären Antikörper bindet. Nach Benetzung der PVDF-Membran mit Luminol führt dessen HRP vermittelte Oxidation zu Chemilumineszenz im Bereich der gebundenen Sekundärantikörper. Die auftretende Chemilumineszenz wurde in einem Blot-Dokumentationssystem (Vilber, Frankreich) detektiert und aufgezeichnet.

Zu Beginn der Immunodetektion wurde die Membran mit 5% Trockenmilchpulver in 1x TBS-T (0,05% Tween) für 30 min bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Nach Zugabe des Primärantikörpers im Verhältnis 1 : 1000 in 5% Trockenmilchpulver, in 1 x TBS-T (rabbit anti human-TRPM8 monoklonal oder rabbit anti human-TRPM2 polyklonal, Abcam, Großbritannien) wurde die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert, gefolgt von drei fünfminütigen Waschsritten in TBS-T bei RT. Anschließend wurde die gewaschene Membran mit dem sekundären Antikörper (goat anti rabbit HRP-konjugiert, DAKO Dänemark, 1 : 1000 in 5% Trockenmilchpulver in 1x TBS-T) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei zehnminütigen Waschsritten in TBS-T bei RT wurde die Membran dünn mit Luminol (Perkin-Elmer, USA) benetzt und in Abhängigkeit von der Signalstärke zwischen 10 s und 30 min im Blot-Dokumentationssystem aufgezeichnet.

### 3.5 Datenanalyse und Statistik

Aus den in dieser Arbeit erhobenen Mess-Datenreihen wurden jeweils der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) ermittelt, wobei der SEM stets die Fehlerbalken in den gezeigten Diagrammen repräsentiert. Die Signifikanz der Daten wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests bzw. bei Bezugnahme mehrerer Datensätze auf einen Kontrolldatensatz durch eine Bonferroni-Korrektur ermittelt. Die Datensätze der jeweiligen Kanaloffenwahrscheinlichkeit ( $P_{\text{open}}$ ) in Abhängigkeit von der Spannung (V) wurden mittels einer Boltzmann-Sigmoidfunktion gefittet.

Angewendete Sigmoidalfunktion:  $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + \exp(V_{50} - X / \text{Slope}))$

Für die Datenanalyse wurde ausschließlich PRISM™ 4 (GraphPad Software, Inc.) sowie Excel 2010 (Mikrosoft) Software verwendet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Einfluss der Transmembrandomäne S3 auf das Schaltverhalten von TRPM8 und TRPM2

Sowohl der TRPM8- als auch der TRPM2-Kanal besitzen in der Transmembrandomäne S3 das innerhalb der spannungsgesteuerten Kationenkanäle hochkonservierte Sequenzmotiv N-x-x-D, wobei die beiden mittleren Aminosäurereste (x-x) in der Regel hydrophobe Seitenketten aufweisen (Kumánovics et al., 2002). Außer bei den spannungsgesteuerten Kationenkanälen ist dieses auch als Sensormodul bezeichnete Motiv ebenfalls bei einigen nicht-spannungsgesteuerten TRP-Kanälen, wie TRPM2 konserviert (TRPM8: N799 – D802; TRPM2: N869 – D872, s. Abb. 13).

Für TRPM8 konnte gezeigt werden, dass die äußeren Aminosäurereste des Sensormoduls N799 und D802 sowie der weiter C-terminal gelegene Aminosäurerest G805 für die Aktivierung des Kanals durch den synthetischen Wirkstoff Icilin eine entscheidende Rolle spielen. Es wurde allerdings nicht im Detail analysiert, inwieweit diese Aminosäurereste an der Spannungssensitivität, an der Aktivierbarkeit von TRPM8 durch Menthol und Kälte bzw. an der strukturellen Integrität des Kanals beteiligt sind (Chuang et al., 2004).

	S3			
<i>TRPM8</i>	YFADIW	NVMD	TLGLFYFIAGIVFRL	(793–817)
<i>TRPM2</i>	YFSDFW	NKLD	VGAILLFFVAGLTCRL	(863–887)
<i>TRPA1</i>	YFMDIS	NVLE	WIIYTTGII FVLPLF	(799–823)
<i>TRPC3</i>	YILQLW	NVLD	FGMLSIFIAAFTARF	(452–476)
<i>ShH4</i>	FCRDVM	NVID	IIAIIIPYFITLATVV	(307–331)
<i>SCN2A (D4)</i>	YFTIGW	NI FD	FVVVILSIVGMFLAE	(1589–1613)
<i>NaChBac</i>	FERSSW	NWFD	FLIVAAGHIFAGAQF	(84–108)
<i>CACNA1C (D4)</i>	YFSDPW	NVFD	FLIVIGSIIDVILSE	(1298–1322)

**Abb. 13:** Sequenzvergleich des zentralen Abschnitts der Transmembrandomäne S3 bei verschiedenen, spannungsabhängigen und spannungsunabhängigen Kationenkanälen. Die Aminosäuresequenzen sind im Einzelbuchstabencode angegeben. Das hochkonservierte Sensormodul der einzelnen Kanäle ist mit einem Rechteck umrahmt. Die äußeren bzw. inneren Aminosäurereste sind farblich hervorgehoben. Das für die Icilinsensitivität des TRPM8-Kanals ebenfalls essentielle Glycin an Stelle 805 ist blau markiert (vgl. Winking et. al., 2012).

Die Tatsache, dass das S3-Sequenzmotiv auch bei TRPM2 hochkonserviert ist, obwohl dieser Kanal einen von TRPM8 völlig verschiedenen Aktivierungsmechanismus besitzt, legt die Vermutung nahe, dass diese Sequenz eine über die bloße Icilinsensitivität hinaus gehende funktionelle Bedeutung für diese beiden Kanäle haben könnte.

Um die strukturelle und funktionelle Bedeutung des N-x-x-D-Sequenzmotives für das Schaltverhalten von TRPM8 und TRPM2 detailliert zu untersuchen, wurden zunächst Kanalmutanten generiert, bei denen eine gezielte Veränderung der beiden äußeren Aminosäurereste vorgenommen wurde. Der Fokus lag dabei mehr auf der Variation der relativen Positionen dieser Aminosäurereste innerhalb des Sensormoduls (s. Tab. 2) und weniger auf deren Seitenkette, was bereits ausführlich von Chuang et al. (2004) untersucht wurde.

Neben der Funktion der äußeren Aminosäurereste wurde auch die strukturelle und funktionelle Bedeutung der zentralen Aminosäurereste durch deren wechselseitigen Austausch zwischen TRPM2 und TRPM8 (K-L ↔ V-M) analysiert (s. Tab. 2).

**Tabelle 2:** Variationen des N-x-x-D Motivs und die damit verbundene Nomenklatur, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde. Die veränderten Aminosäurereste sind rot hervorgehoben.

Mutationen TRPM8	Sensormodul Sequenz
wt-TRPM8	N-V-M-D
M8-N799D	D-V-M-D
M8-D802N	N-V-M-N
M8-N799D+D802N	D-V-M-N
M8-V800K+M801L	N-K-L-D
Mutationen TRPM2	
wt-TRPM2	N-K-L-D
M2-N869D	D-K-L-D
M2-D872N	N-K-L-N
M2-N869D+D872N	D-K-L-N
M2-K870V+L871M	N-V-M-D

Die verschiedenen Kanalvarianten wurden in HEK-293-Zellen heterolog exprimiert und durch Whole-Cell-Patch-Clamp Analysen funktionell charakterisiert. Zur Überprüfung der Oberflä-

chenexpression der einzelnen Kanalvarianten in den transient transfizierten HEK-Zellen wurden Plasmamembranfraktionen mittels Western-Blot Analyse untersucht.

#### **4.1.1 Einfluss der äußeren Reste des Sensormoduls auf das Schaltverhalten von TRPM8**

Zunächst wurde die Bedeutung der relativen Positionen der äußeren Aminosäurereste des Sensormoduls für das Schaltverhalten von TRPM8 analysiert. Zu diesem Zweck erfolgte eine Überprüfung der funktionellen Auswirkungen der Mutanten M8-N799D, M8-D802N und M8-N799D+D802N auf die Menthol- und Kältesensitivität, die Spannungssensitivität sowie auf die Oberflächenexpression von TRPM8.

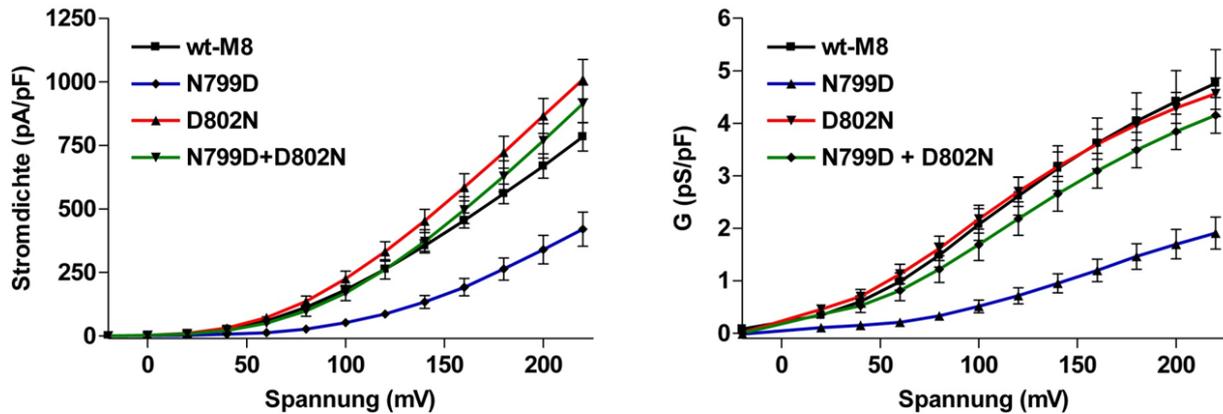
##### **4.1.1.1 Die äußeren Reste des Sensormoduls beeinflussen die Spannungsabhängigkeit von TRPM8**

Die Patch-Clamp-Messungen zur Bestimmung der Spannungsabhängigkeit wurden, wie im Methodenteil (s. Kap. 3.2.2.7) beschrieben, durchgeführt. Um eine Verfälschung der Daten durch Temperatur-Effekte zu vermeiden, fanden die Messungen bei ca. 30°C und damit oberhalb der temperaturbedingten Aktivierungsschwelle von wt-TRPM8 (< 26°C) statt.

Zu Beginn einer jeden Messung erfolgte nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration die Messung eines Spannungsstufenprotokolls. Aus diesen initialen Spannungsstufenprotokollen ließ sich die Strom-Spannungs-Beziehung (I/V-Beziehung) der einzelnen TRPM8-Kanalvarianten bestimmen. Die gemessenen Ströme wurden stets auf die Membranfläche der jeweils untersuchten HEK-293-Zelle (Kapazität der Zelle, pA/pF) normiert.

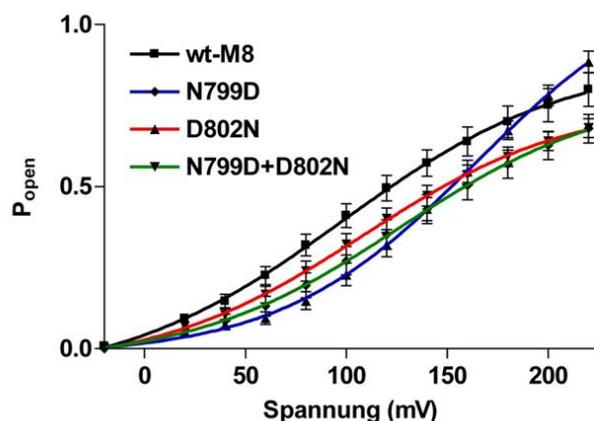
Die Werte der elektrischen Leitfähigkeiten (G) in Abhängigkeit von der Spannung wurden aus den Daten der I/V-Messungen berechnet. Die Bestimmung der I/V- sowie der G/V-Beziehungen der unterschiedlichen Kanalvarianten dient einer ersten Abschätzung der Spannungsabhängigkeit, wobei zu berücksichtigen ist, dass mögliche Unterschiede in deren Oberflächenexpression damit nicht erfasst werden.

Die I/V-Kurven sowie die daraus berechneten G/V-Kurven aller drei Sensormodulmutanten zeigen die für TRPM8 charakteristische Auswärtsrektifizierung, wobei im Vergleich mit dem wt-TRPM8-Kanal nur die TRPM8-Mutante M8-N799D eine deutliche Abschwächung der Stromdichte bzw. der Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Spannung zeigt. Die beiden anderen TRPM8-Mutanten, M8-D802N und M8-N799D+D802N weisen hingegen eine gegenüber wt-TRPM8 geringfügig erhöhte Stromdichte bzw. Leitfähigkeit auf.



**Abb. 14:** I/V- und G/V-Kurven der einzelnen TRPM8-Sensormodulmutanten im Vergleich zu wt-TRPM8. Die I/V-Messungen erfolgten mittels des Spannungsstufenprotokolls 1 (SSP1, stufenweise Depolarisation in 20 mV-Schritten von -60 mV bis +220 mV, s. Kap. 3.2.2.11 / Abb. 9) bei 30°C. Die Werte der elektrischen Leitfähigkeiten (G) in Abhängigkeit von der Spannung wurden aus den Daten der I/V-Messungen berechnet. In beiden Diagrammen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (6 - 9 unabhängige Experimente) im Spannungsbereich zwischen -20 mV bis +220 mV dargestellt. Die gemessenen Stromdichten sowie die daraus abgeleiteten elektrischen Leitfähigkeiten wurden jeweils auf die Membranfläche der untersuchten HEK-293-Zelle (Kapazität der Zelle, pA/pF) normiert.

Die genaue Analyse der Effekte der Mutationen N799D, D802N und N799D + D802N auf die Spannungsabhängigkeit von TRPM8 wurde, wie im Methodenteil beschrieben, (s. Kap. 3.2.2.7) nach einer von Voets et al. (2007) etablierten Methode durchgeführt. Durch die Bestimmung der relativen Offenwahrscheinlichkeit ( $P_{\text{open}}$ ) in Abhängigkeit von der Spannung ist es möglich, präzisere Aussagen über die Auswirkung der jeweiligen Mutation auf die Spannungsabhängigkeit von TRPM8 zu machen.  $P_{\text{open}}$  ist definiert als  $G/G_{\text{max}}$ , wobei G die elektrische Leitfähigkeit (I/U) der Zellmembran in Abhängigkeit von der angelegten Spannung (-60 mV bis +220 mV, s. Kap. 3.2.2.11 / Abb.9) und  $G_{\text{max}}$  die maximal erreichbare, elektrische Leitfähigkeit der Zellmembran darstellt.  $G_{\text{max}}$  wird dabei durch das Zusammenwirken einer starken Depolarisation (160 mV bis 180 mV, s. Kap. 3.2.2.11 / Abb. 10) und der Anwesenheit einer hohen Konzentration von Menthol (200  $\mu\text{M}$ ) bewirkt. Durch die Kombination aus starker Depolarisation der Zelle und hoher extrazellulärer Menthol-Konzentration wird eine maximale Offenwahrscheinlichkeit der TRPM8-Kanäle gewährleistet ( $P_{\text{open}} \approx 1$ ). Auf eine höhere Depolarisation (>220 mV) wurde in diesem Messverfahren bewusst verzichtet, da hierbei in der Regel irreversible Schäden der Zellmembran hervorgerufen und somit Messartefakte provoziert werden.



**Abb. 15:** Relative Offenwahrscheinlichkeiten ( $P_{\text{open}}$ ) der einzelnen TRPM8-Sensormodulmutanten im Vergleich zu wt-TRPM8. Die  $P_{\text{open}}$ -Werte sind, wie im Text beschrieben, definiert als  $G/G_{\text{max}}$  bei der jeweils angelegten Spannung. Dargestellt sind die, mit einer Boltzmann-Funktion (s. Kap. 3.5) gefitteten Mittelwerte,  $\pm$  SEM (6 - 9 unabhängige Experimente) im Spannungsbereich zwischen -20 mV bis +220 mV.

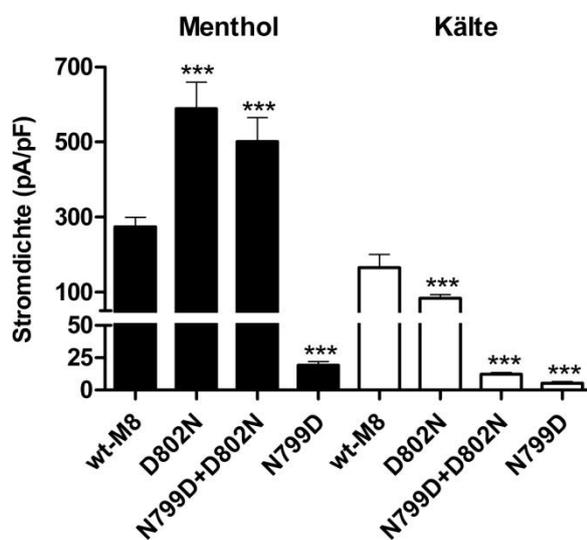
Bei der Betrachtung der Aktivierungskurven (s. Abb 15) sowie der dazugehörigen Parameter der Boltzmann-Funktion (s. Tab. 3) wird deutlich, dass die äußeren Aminosäurereste des Sensormoduls auch für die Spannungssensitivität von TRPM8 von Bedeutung sind. Eine Veränderung der relativen Positionen der äußeren Sensormodulreste bewirkt eine gegenüber wt-TRPM8 unterschiedlich stark ausgeprägte Rechtsverschiebung der Aktivierungskurve. Eine signifikante Rechtsverschiebung zeigt dabei die TRPM8-Kanalvariante N799D mit einem zu wt-TRPM8 um ca. 70 % erhöhten  $V_{50}$ -Wert. Deutlich geringere Veränderungen in der halbmaximalen Aktivierung zeigen hingegen die Kanalvarianten M8-D802N ( $V_{50} \approx +10\%$ ) und M8-N799D+D802N ( $V_{50} \approx +30\%$ ). Interessanterweise ist bei M8-N799D trotz starker Rechtsverschiebung der Aktivierungskurve der prozentuale Anteil der geöffneten Kanäle bei 220 mV Depolarisation im Vergleich zu wt-TRPM8 leicht erhöht. Im Gegensatz dazu sind diese Werte sowohl bei M8-D802N als auch bei M8-N799D+D802N deutlich verringert.

**Tabelle 3:** Parameter der mittels Boltzmann-Funktion gefitteten relativen Offenwahrscheinlichkeiten der TRPM8-Sensormodulmutanten. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 6 - 9)

TRPM8 Kanalvariante	$V_{50}$ (mV)	Steigung (mV)	$P_{\text{open}}$ bei 220 mV (%)
Wild-Typ	$98 \pm 8$	$56 \pm 10$	$80 \pm 5$
N799D	$164 \pm 17$	$49 \pm 11$	$88 \pm 3$
D802N	$108 \pm 5$	$52 \pm 7$	$68 \pm 3$
N799D + D802N	$127 \pm 5$	$52 \pm 6$	$68 \pm 4$

#### 4.1.1.2 Die äußeren Reste des Sensormoduls beeinflussen die Menthol- und Kältesensitivität von TRPM8

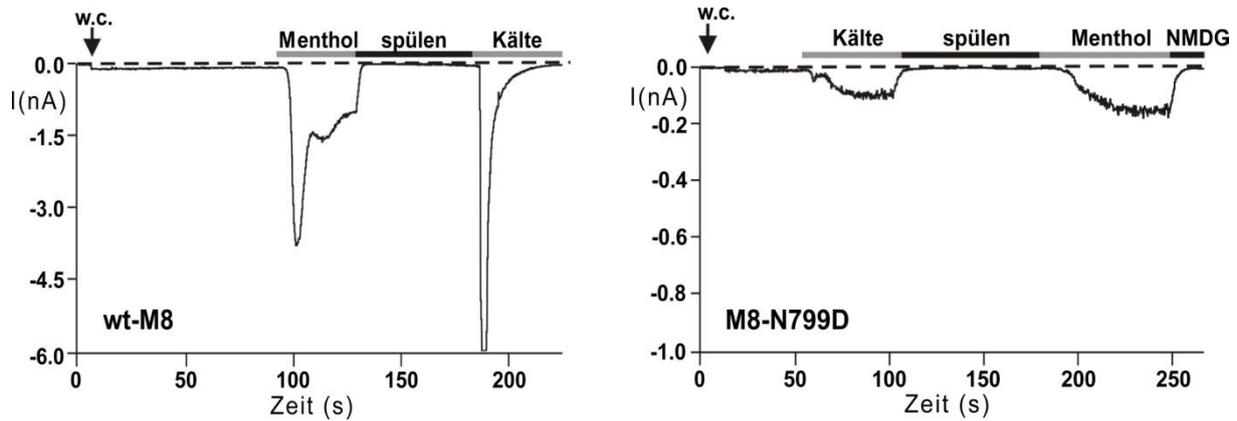
Die Patch-Clamp Experimente zur Bestimmung der Menthol- und Kältesensitivität der einzelnen TRPM8-Mutanten erfolgten, wie im Methodenteil (s. Kap. 3.2.2.6) beschrieben, bei Raumtemperatur. Die für die statistische Auswertung relevanten Daten wurden dabei nur aus Einzelstimulus-Experimenten oder bei Experimenten mit sequenzieller Stimulation ausschließlich für den ersten Stimulus erhoben, um eine Verfälschung der Daten durch Desensitivierungs-Effekte zu vermeiden.



**Abb. 16:** Aktivierbarkeit der verschiedenen TRPM8-Sensormodulmutanten (M8-N799D, M8-D802N und M8-N799D+D802N) durch Menthol- (100  $\mu$ M) und Kälte-Stimulation (10°C) im Vergleich zu wt-TRPM8. Gezeigt werden die durchschnittlichen Einwärtsströme der verschiedenen TRPM8-Kanalvarianten nach Kälte- oder Menthol-Stimulation bei einem Haltepotential von -60 mV genormt auf die jeweilige Zellmembranfläche (pA/pF). Jede Säule zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 10 – 16 unabhängigen Experimenten. Werte mit \*\*\* werden mit  $p < 0.001$  als sehr signifikant angenommen.

Die Veränderung der relativen Positionen der äußeren Aminosäurereste des Sensormoduls von TRPM8 führen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Chuang et al. (2004) zu einem Ausfall der Sensitivität gegenüber Icilin. Keine der drei TRPM8-Sensormodulvarianten ist durch extrazelluläre Applikation, auch von sehr hohen Konzentrationen von Icilin (bis 60  $\mu$ M), aktivierbar (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigten alle drei Mutanten ein deutliches Ansprechverhalten auf Kälte- und Menthol-Stimulation.

HEK-293-Zellen, transfiziert mit der TRPM8-Kanalmutante N799D, zeigen dabei sowohl auf Kälte-Stimulation (10°C) als auch auf Stimulation mit Menthol (100  $\mu$ M) die schwächste Reaktion. Die bei einem Haltepotential von -60 mV und einer Menthol-Konzentration in der Badlösung von 100  $\mu$ M gemessenen Einwärtsströme sind im Vergleich zu wt-TRPM8 um mehr als den Faktor 10 und bei Stimulation mit Kälte sogar um mehr als das 30-fache verringert.

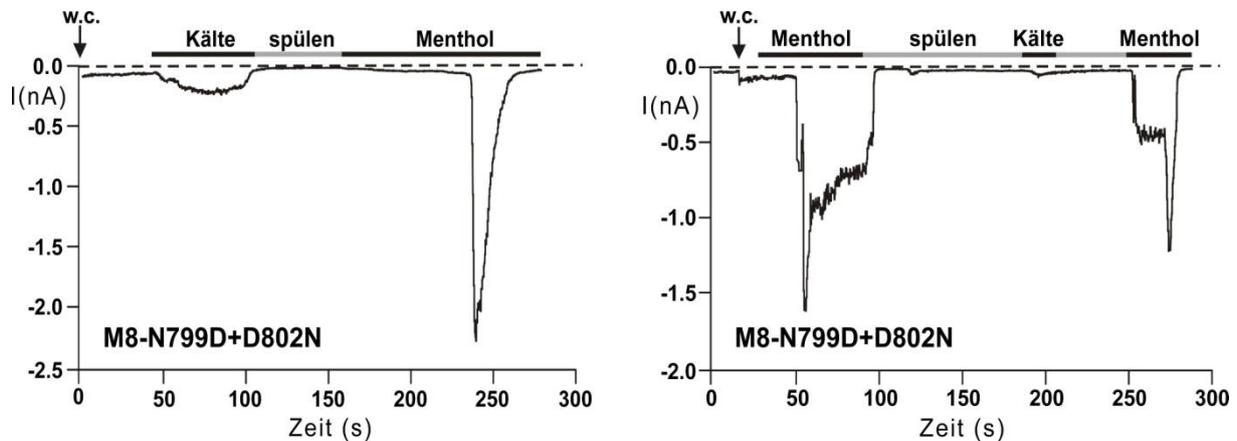


**Abb. 17:** Repräsentative Whole-Cell-Patch-Clamp Messungen von wt-TRPM8 und M8-N799D exprimierenden HEK-293-Zellen. Die Messungen wurden, wie im Methodenteil (s. Kap. 3.2.2.6) beschrieben, bei einem Haltepotential von  $-60$  mV und bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration (w.c.) erfolgte eine sequenzielle Stimulation mit  $100 \mu\text{M}$  Menthol bzw. eiskalter Badlösung ( $10^\circ\text{C}$ ). Zwischen den beiden Stimulationen fand ein Waschschrift mit Standard-Badpuffer bei Raumtemperatur statt.

Die beiden Sensormodulmutanten M8-D802N und M8-N799D+D802N zeigen im Gegensatz zu wt-TRPM8 eine gesteigerte Sensitivität gegenüber einer Stimulation durch Menthol wogegen die Empfindlichkeit gegenüber Kälte abnimmt. Die größte Divergenz im Ansprechverhalten auf Menthol und Kälte gegenüber wt-TRPM8 zeigt dabei die Kanalvariante M8-N799D+D802. Die Sensitivität gegenüber Menthol ist ca. 2-fach gesteigert bei einer mehr als 10-fach verringerten Aktivierbarkeit durch Kälte. Dieses unterschiedliche Ansprechverhalten gegenüber einer Stimulation durch Kälte und Menthol konnte in dieser Art bisher noch nicht gezeigt werden. In bisherigen Studien bewirkten Mutationen von TRPM8, wenn sie die Menthol- und Temperatursensitivität betrafen, eine gleichsinnige Ab- oder Zunahme sowohl der Menthol- als auch der Kältesensitivität (Voets et al., 2007) bzw. eine Abnahme der Mentholsensitivität bei annähernd gleichbleibender Kältesensitivität (Bandell et al., 2006).

In Abbildung 18 sind die entsprechenden Experimente mit aufeinanderfolgender Applikation der Stimuli ( $n=6$ ) Kälte und Menthol exemplarisch gezeigt. Aufgrund der geringen Sensitivität der Kanalvariante M8-N799D+D802N gegenüber niedrigen Temperaturen wurde in diesen Experimenten Kälte als erster Stimulus gewählt. Eine geringe Aktivierung durch Kälte bewirkt daher kaum Desensitivierungs-Effekte auf die zweite Stimulation mit Menthol, welche eine bis zu 15-fach verstärkte Aktivierung hervorruft. In Experimenten mit umgekehrter Reihenfolge der Stimulation fällt die Kälteantwort auf Grund der vorausgegangenen starken Mentholantwort und der damit einhergehenden starken Desensitivierung noch schwächer

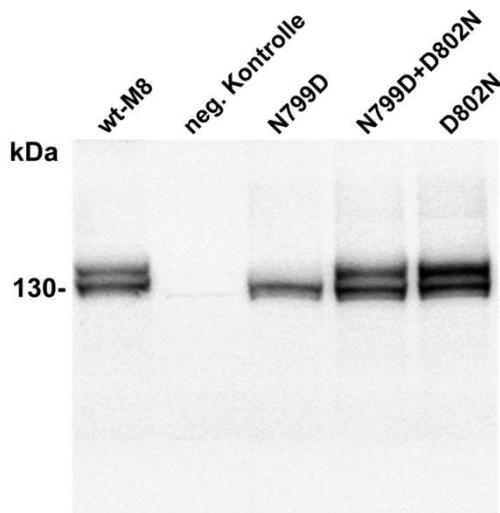
als üblich aus. Die anschließend wiederholte Stimulation mit Menthol ist aus demselben Grund (Desensitivierung) ebenfalls vermindert.



**Abb. 18:** Repräsentative Whole-Cell-Patch-Clamp Messungen von M8-N799D+D802N exprimierenden HEK-293-Zellen. Die Messungen wurden, wie im Methodenteil (s. Kap. 3.2.2.6) beschrieben, bei einem Haltepotential von  $-60$  mV bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration (w.c.) wurden die Stimuli ( $100$   $\mu$ M Menthol oder  $10^{\circ}\text{C}$  Kälte) sequenziell appliziert. Zwischen den Stimulationen erfolgte jeweils ein Waschschrift mit Standard Badpuffer bei Raumtemperatur.

#### 4.1.1.3 Einfluss der äußeren Reste des Sensormoduls auf die Oberflächenexpression von TRPM8

Neben der funktionellen Charakterisierung mittels Patch-Clamp-Analyse wurde, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, die Oberflächenexpression sowie die posttranslationale Modifikation der TRPM8-Kanalvarianten M8-N799D, M8-D802N und M8-N799D+D802N mittels Western-Blot-Analyse (s. Kap. 3.4.5) untersucht. Die unterschiedlichen Banden im Western-Blot entsprechen dabei verschiedenen Glykosylierungsstadien des TRPM8-Proteins (Erlor et al., 2006), wobei es sich um eine N-Glykosylierung des Aminosäurerestes 934 in der putativen Kanalpore handelt. Für den TRPM8-Kanal sind drei Banden charakteristisch, wenngleich sich die beiden unteren Banden häufig aufgrund einer geringen Differenz des Molekulargewichts überlagern. Die untere Bande umfasst sowohl die meist schwach ausgeprägte Bande des unglykosylierten Kanals als auch eine frühe, nicht vollständig glykosylierte Form des TRPM8-Proteins (Mannose Typ, Pertusa et al., 2012). Die vollständig glykosylierte Form des gereiften TRPM8-Kanals wird hingegen aufgrund des größeren Molekulargewichts durch die oberste Bande repräsentiert.



**Abb. 19:** Western-Blot-Analyse der Plasmamembranfraktionen von wt-TRPM8, M8-N799D, M8-D802N und M8-N799D+D802N exprimierenden HEK-293-Zellen sowie von mit dem Vektorplasmid transfizierten HEK-293-Zellen als Negativ-Kontrolle. Die Oberflächenexpression sowie der Glykosylierungsstatus von wt-TRPM8, M8-D802N und M8-N799D+D802N werden mit der für TRPM8 typischen Doppel-Bande im Bereich von 130 kDa nahezu identisch dargestellt. Im Gegensatz dazu fehlt der TRPM8-Kanalvariante N799D die obere Bande der vollständig glykosylierten Form.

Die mittels der Zentrifugationsmethode (s. Kap. 3.4.2) gewonnenen Plasmamembranfraktionen von wt-TRPM8, M8-D802N und M8-N799D+D802N transfizierten HEK-293-Zellen zeigen im Western-Blot ähnlich stark ausgeprägte Doppelbanden im Bereich von 130 kDa. Diese für TRPM8 typische Doppelbande bei M8-D802N und M8-N799D+D802N deutet auf eine zu wt-TRPM8 ähnliche Oberflächenexpression sowie eine weitgehend identische posttranslationale Modifikation hin. Einen deutlichen Unterschied dazu bildet die TRPM8-Kanalvariante N799D. Im Vergleich zu wt-TRPM8, M8-D802N und M8-N799D+D802N ist hier eine deutlich schwächere Einzelbande sichtbar, die eine unvollständig glykosylierte Form von TRPM8 repräsentiert.

## 4.2 Einfluss der äußeren Reste des Sensormoduls auf das Schaltverhalten von TRPM2

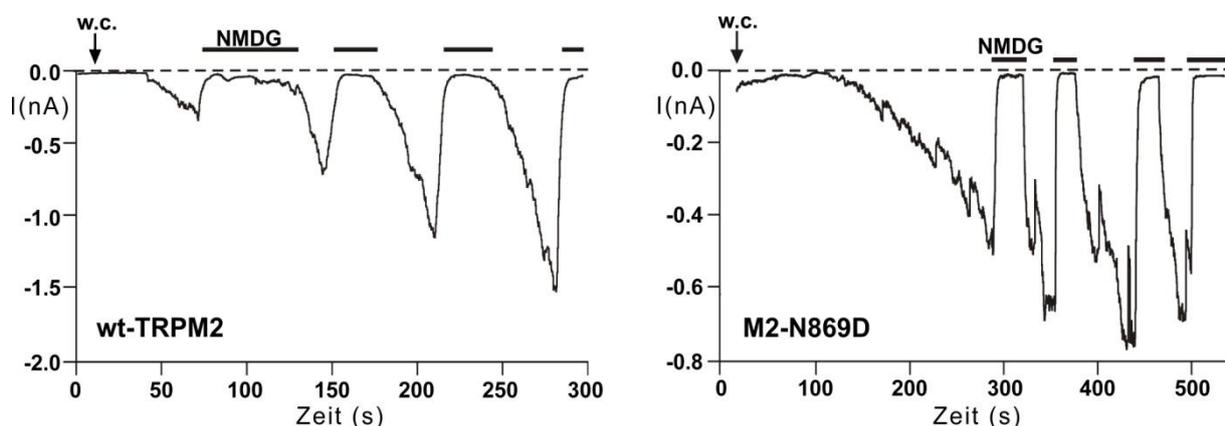
Der nächste Verwandte von TRPM8 innerhalb der TRP-Familie, TRPM2, besitzt ebenfalls das konservierte N-x-x-D-Sequenzmotiv in der Transmembrandomäne S3, zeigt jedoch ein völlig unterschiedliches Aktivierungsmuster. TRPM2 ist nicht sensitiv gegenüber Menthol bzw. Icilin, zeigt keine Spannungsabhängigkeit (Kühn et al., 2010) und ist im Gegensatz zu TRPM8 durch Wärme (>35°C) sowie durch intrazelluläre Applikation von ADP-Ribose aktivierbar (Perraud et al., 2001; Hara et al., 2002; Wehage et al., 2002; Inamura et al., 2003; Togashi et al., 2006). Im Unterschied zu TRPM8 wurde die Bedeutung des N-x-x-D-Sequenzmotives für das Schaltverhalten von TRPM2 bisher noch nicht untersucht. Um die funktionellen Auswir-

kungen gezielter Veränderungen im S3-Sensormodul von TRPM2 zu analysieren, wurde analog zur Untersuchung des Sensormoduls von TRPM8 zunächst ein Austausch der äußeren Aminosäurereste (N869D, D872N und N869D + D872N) vorgenommen.

Die Patch-Clamp Experimente zur funktionellen Charakterisierung der verschiedenen TRPM2-Mutanten erfolgten bei Raumtemperatur in der Whole-Cell-Konfiguration, wie im Methodenteil beschrieben (s. Kap. 3.2.2.8). Um eine etwaige Abweichung vom normalen Schaltverhalten des Wildtypkanals feststellen zu können, wurde mit ADPR in Abwesenheit bzw. Anwesenheit des Koagonisten Calcium stimuliert (0,1 bis 1 mM ADPR in  $\text{Ca}^{2+}$  freien- (< 10 nM) bzw.  $\text{Ca}^{2+}$  haltigen Medium (1  $\mu\text{M}$ )).

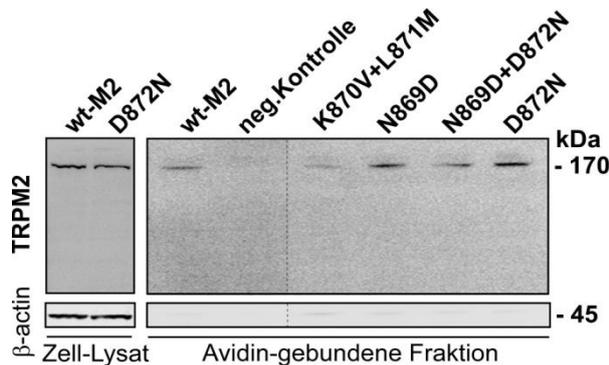
Die TRPM2-Mutante M2-N869D zeigt bei Stimulation mit ADPR ein nahezu identisches Verhalten wie der wt-TRPM2-Kanal (n = 16) mit einer deutlich gesteigerten Kinetik und zunehmender Amplitude der Einwärtsströme in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ . Im Gegensatz dazu weisen die TRPM2-Sensormodulmutanten M2-D872N und M2-N869D+D872N einen vollständigen Funktionsverlust auf. Sowohl bei M2-D872N (n = 27) als auch bei M2-N869D+D872N (n = 27) transfizierten HEK-Zellen konnten trotz Stimulation mit hohen Konzentrationen von ADPR auch in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  keine Einwärtsströme gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise zeigen diese Ergebnisse, dass analoge Mutationen im S3-Sensormodul von TRPM8 und TRPM2 entgegengesetzte Auswirkungen auf das Schaltverhalten haben.



**Abb. 20:** Repräsentative Whole-Cell-Patch-Clamp Messungen von wt-TRPM2 und M2-N869D. Die Messungen erfolgten, wie im Methodenteil (s. Kap. 3.2.2.8) beschrieben, bei einem Haltepotential von -60 mV bei Raumtemperatur. Nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration (w.c.) wurden die zunehmenden Einwärts-Ströme ab Stromamplituden von 0,5 – 1 nA in kurzen Abfolgen mit NMDG inhibiert und mit Standard-Badpuffer wieder reaktiviert.

Um auszuschließen, dass mögliche Störungen der Expression oder fehlerhafte Reifungsprozesse innerhalb der Zelle für den beobachteten Funktionsverlust von M2-D872N und M2-N869D+D872N verantwortlich sind, wurde die Oberflächenexpressionen sowie mögliche posttranslationale Modifikationen der TRPM2-Sensormodulmutanten mittels Western-Blot Analyse untersucht.



**Abb. 21:** Nachweis der Oberflächenexpression der TRPM2-Sensormodulmutanten mittels Biotinylierungsassay (s. Kap. 3.4.1) und Western-Blot-Analyse. Als Negativ-Kontrolle dienten Plasmidvektor transfizierte HEK-293-Zellen. Die ausschließliche Biotinylierung von Oberflächenproteinen wurde mittels Inkubation des Blots mit einem Anti- $\beta$ -Actin Antikörper überprüft und durch die Abwesenheit einer  $\beta$ -Actin-Bande im Bereich von 45 kDa bestätigt. Der linke Blot reflektiert die Gesamtexpression an TRPM2 und  $\beta$ -Actin im Gesamtzellextrakt vor der Aufreinigung mittels Avidin.

Die Western-Blot-Analyse der Oberflächenbiotinylierung zeigt sowohl bei wt-TRPM2 als auch bei allen drei TRPM2-Sensormodulmutanten (M2-N869D, M2-D872N und M2-N869D + D872N) die typische Einzelbande im Bereich von 170 kDa, was auf eine weitgehend identische Oberflächenexpression schließen lässt. Weder bei wt-TRPM2 noch bei einer der Sensormodulmutanten sind posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen gelelektrophoretisch nachzuweisen. Neben der TRPM2-typischen Einzelbande bei ca. 170 kDa, ist in allen Proben oberhalb von 170 kDa noch eine schwache Bande zu beobachten. Da auch die Negativ-Kontrolle diese Bande oberhalb von 170 kDa aufweist, handelt es sich um eine unspezifische Antikörperfärbung.

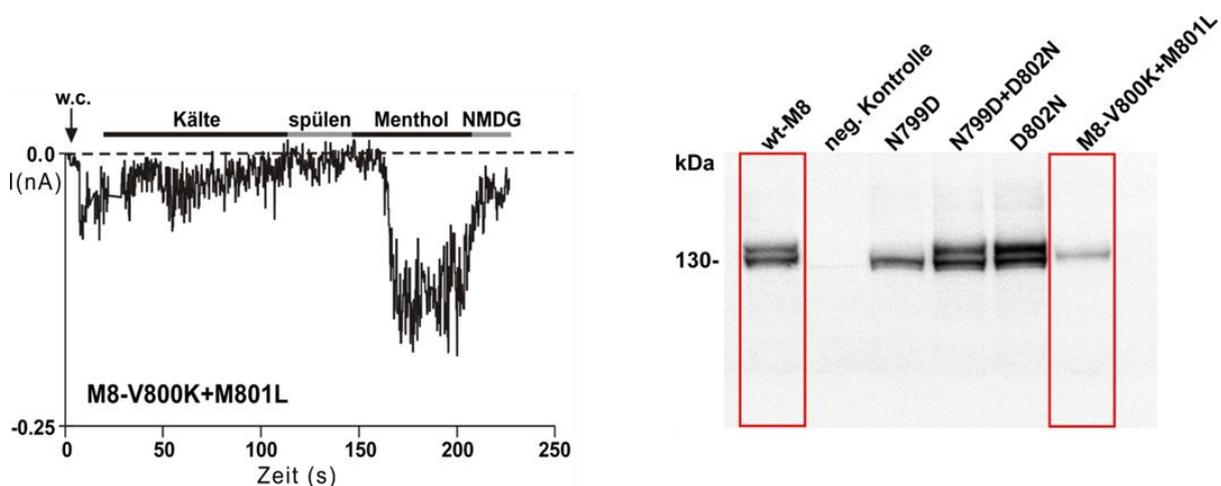
### 4.3 Einfluss der inneren Aminosäurereste des N-x-x-D- Sequenzmotivs auf das Schaltverhalten und die Oberflächenexpression von TRPM8 und TRPM2

Die inneren Aminosäurereste des TRPM8-N-x-x-D-Sequenzmotivs unterscheiden sich deutlich von denen des TRPM2-Kanals. Mit den Aminosäureresten Valin und Methionin besitzt

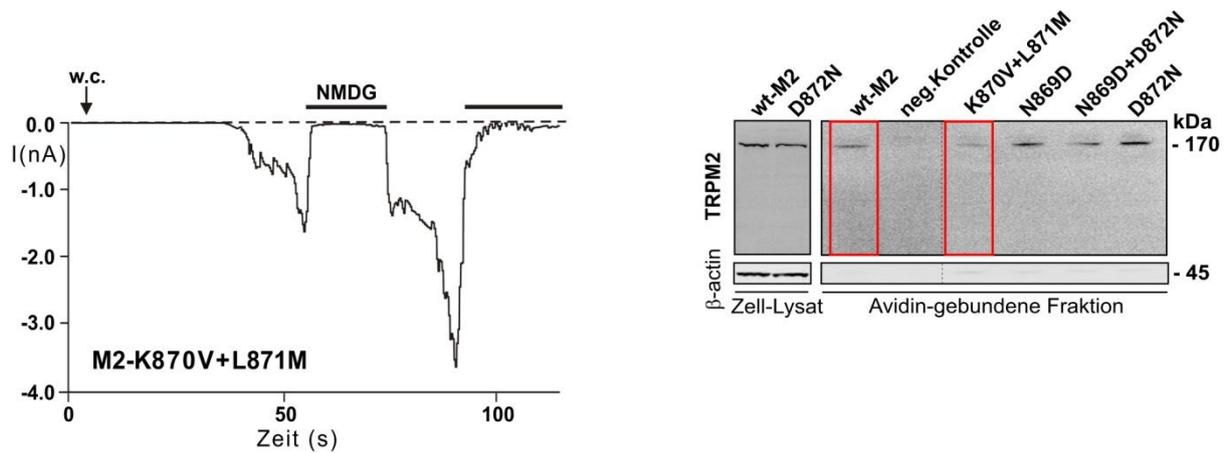
der TRPM8-Kanal zwei ungeladene, relativ hydrophobe Aminosäurereste, wohingegen bei TRPM2 einer der beiden Aminosäurereste stark basisch ausgeprägt ist.

Um zu klären welche Bedeutung die inneren Reste des Sensormoduls für die Aktivierung von TRPM8 und TRPM2 haben, wurde ein Austausch der inneren Aminosäurereste zwischen TRPM8 und TRPM2 durchgeführt (M8-V800K+M801L und M2-K870V+L871M) und die Mutanten elektrophysiologisch mittels Whole-Cell-Patch-Messungen charakterisiert. Im Anschluss fand eine Überprüfung möglicher Auswirkungen dieser Manipulationen auf die Oberflächenexpression sowie etwaiger posttranslationaler Modifikationen mittels Western-Blot-Analysen der Zellmembranfraktionen statt.

Die TRPM8-Kanalvariante mit der Sensormodulesequenz des TRPM2-Kanals (M8-V800K+M801L) zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie die TRPM8-Mutante N799D mit einer stark eingeschränkten Aktivierbarkeit durch Kälte und Menthol sowie einem Ausfall der Sensitivität gegenüber Icilin (nicht gezeigt). Darüber hinaus weist die Plasmamembranfraktion von M8-V800K+M801L exprimierenden HEK-Zellen im Western-Blot nur die untere Bande im Bereich von 130 kDa auf. Ähnlich wie bei M8-N799D fehlt auch hier die entsprechende Bande des vollständig glykosylierten Kanalproteins.



**Abb. 22:** Repräsentative Whole-Cell-Patch-Clamp Messung und Western-Blot-Analyse der TRPM8-Kanalvariante V800K+M801L. Die Messungen erfolgten, wie im Methodenteil (s. Kap. 3.2.2.6) beschrieben, bei einem Haltepotential von -60 mV bei Raumtemperatur. Nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration (w.c.) wurden sequenziell die Stimuli (10°C Kälte und 100  $\mu$ M Menthol) appliziert. Zwischen den Stimulationen fand jeweils ein Waschschritt mit Standard-Badpuffer bei Raumtemperatur statt. Der rechte Blot zeigt die gegen TRPM8 gefärbten Plasmamembranfraktionen von wt-TRPM8 und M8-V800K+M801L.



**Abb. 23:** Repräsentative Whole-Cell-Patch-Clamp Messung sowie Western-Blot-Analyse der TRPM2-Kanalvariante K870V+L871M. Die Messungen wurden, wie im Methodenteil (s. Kap. 3.2.2.8) beschrieben, bei einem Haltepotential von -60 mV bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration (w.c.) wurden die steigenden Einwärts-Ströme ab Stromamplitude von ca. 1 nA, in einer kurzen Abfolge mit NMDG inhibiert und mit Standard-Badpuffer wieder reaktiviert. Der rechte Blot zeigt die gegen TRPM2 gefärbten Oberflächenexpressionen von wildtyp-TRPM2 und M2-K870V+L871M.

Anders als bei der TRPM8-Kanalvariante V800K+M801L führt der Austausch der inneren Reste des Sensormoduls von TRPM2 gegen die entsprechenden Aminosäurereste aus TRPM8 (M2- K870V+L871M) nicht zu einer Einschränkung der Funktion. HEK-293-Zellen, die mit M2-K870V+L871M transfiziert sind, reagieren bei Stimulation mit ADPR (s. Abb. 23) mit TRPM2-typischen Strömen. Auch die Western-Blot-Analyse der Oberflächenexpression zeigt mit der TRPM2-typischen Einzelbande im Bereich von 170 kDa keine Unterschiede zu wt-TRPM2.

#### 4.4 Interaktion zwischen den Transmembrandomänen S3 und S4 in TRPM8

In einer auf einem Computersimulationsmodell basierenden Studie von Pedretti et al. (2011) bezüglich des Schaltverhaltens von TRPM8 wird angenommen, dass die Interaktion des Kanals mit Icilin bzw. Menthol zu einer Bewegung der Transmembrandomäne S3 hin zur Transmembrandomäne S4 führt. Im besonderen Fokus dieses Modells lagen die Aminosäurereste D802 des N-x-x-D-Sequenzmotivs in S3 sowie R842 des postulierten Spannungssensors der Transmembrandomäne S4 (Voets et al., 2007), für die eine elektrostatische Interaktion vorhergesagt wurde. Diese Interaktion könnte nach diesem Modell eine Konformationsänderung von S4 und somit letztendlich die Öffnung des Kanals hervorrufen (Pedretti et al., 2011).

Basierend auf den Computersimulationsergebnissen von Pedretti et al. (2011) sowie den Ergebnissen von Papazian et al. (1995) wurde als Teil dieser Arbeit nach einem experimentellen Beweis für die postulierte spezifische Interaktion zwischen der Transmembrandomäne S3 und der Transmembrandomäne S4 gesucht. Zu diesem Zweck wurden diverse TRPM8-Kanalvarianten mit Ladungsmodifikationen innerhalb der Transmembrandomäne S3 und Transmembrandomäne S4 generiert und analysiert. Im Fokus dieser Untersuchung standen dabei die Aminosäurereste D802 in S3 und R842 in S4.

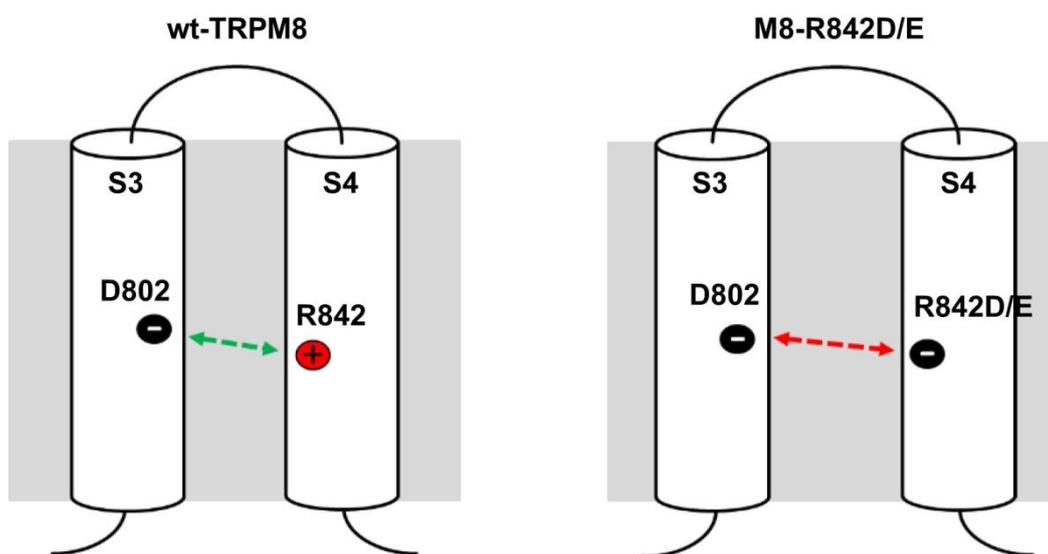
**Tabelle 4:** Übersicht der verschiedenen TRPM8-Kanalvarianten, die zur Analyse einer spezifischen Interaktion zwischen S3 und S4 analysiert wurden

Mutationen in S3 (TRPM8)	Mutationen in S4 (TRPM8)	Mutationen in S3 + S4 (TRPM8)
D802R	R842E	D802R + R842E
D796R	R842D	D802R + R842D
	D835R	D796R + R842D
		D802R + D835R
		D802N + R842D

Sowohl D802 als auch R842 sind von herausragender Bedeutung für das Schaltverhalten von TRPM8. Der innerhalb der Transmembrandomäne S3 hochkonservierte Aminosäurerest D802 ist einerseits essentiell für die Aktivierbarkeit von TRPM8 durch den synthetischen Wirkstoff Icilin (Chuang et al., 2004) und darüber hinaus wichtig für die Spannungs-, Kälte- und Mentholsensitivität des Kanals (diese Arbeit). Der Aminosäurerest R842 der Transmembrandomäne S4 trägt maßgeblich zur Spannungssensitivität des Kanals bei und ist mitverantwortlich für den Einfluss von Kälte und Menthol auf das TRPM8-Schaltverhalten (Voets et al., 2007). Bislang nicht untersucht wurde, inwieweit die zentrale Bedeutung für das Schaltverhalten von TRPM8, die die beiden Aminosäurereste jede für sich genommen einnehmen, durch eine mögliche elektrostatische Interaktion untereinander zustande kommt.

#### 4.4.1 Funktionelle Auswirkung der Ladungsumkehrmutation R842D bzw. R842E

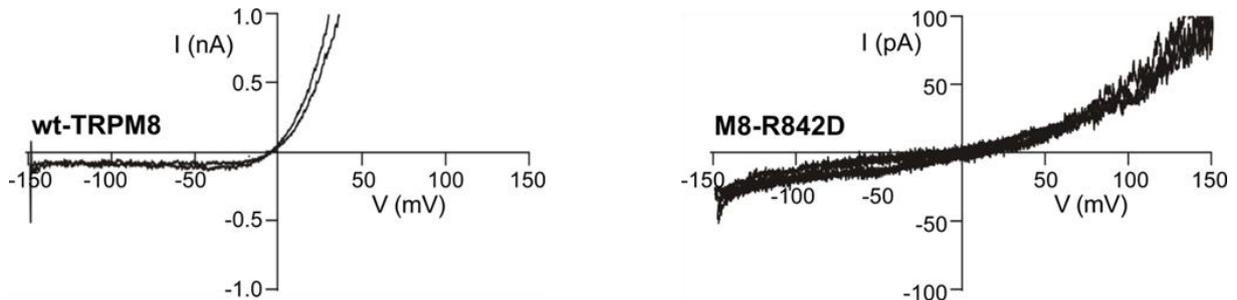
In den durchgeführten Experimenten wurde erstmals die Auswirkung einer Ladungsumkehrmutation des Aminosäurerestes R842 mittels der Mutanten M8-R842D und M8-R842E auf das Schaltverhalten von TRPM8 analysiert. Entsprechend dem von Pedretti et al. (2011) vorgeschlagenen Modell sollten diese beiden Mutationen eine direkte positive elektrostatische Wechselwirkung (elektrische Anziehung) zwischen D802 der Transmembrandomäne S3 und R842 in S4 unmöglich machen. Die Auswirkungen dieser Mutationen auf das Schaltverhalten von TRPM8 konnten mittels Whole-Cell-Patch-Clamp Messungen bestimmt werden. Zusätzlich wurden mögliche Auswirkungen dieser Mutationen auf den Glykosylierungsstatus und die Oberflächenexpression von TRPM8 durch Western-Blot-Analyse untersucht.



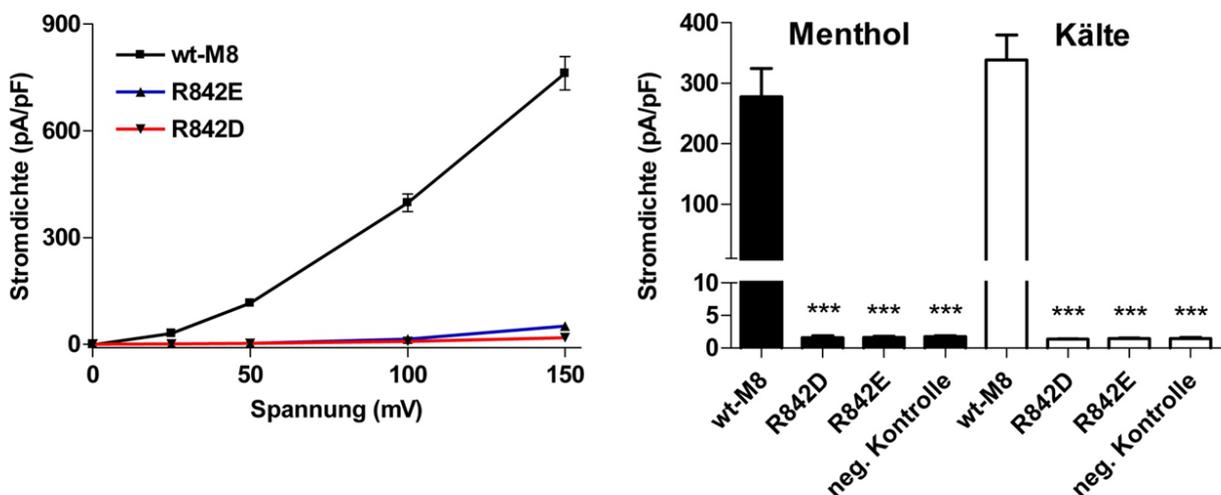
**Abb. 24:** Modell möglicher elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den Transmembrandomänen S3 und S4 von wt-TRPM8 im Vergleich zu M8-R842D/E. Elektrische Anziehungskräfte zwischen entgegengesetzten Ladungen sind durch grüne Doppelpfeile, elektrische Abstoßungskräfte zwischen gleichen Ladungen durch rote Doppelpfeile gekennzeichnet.

Der Austausch des basischen Argininrestes an Position 842 in der Transmembrandomäne S4 durch ein saures Aspartat bzw. Glutamat (R842D und R842E) führt in beiden Fällen zu einem kompletten Funktionsverlust von TRPM8. M8-R842D und M8-R842E zeigen weder in ihrer Spannungssensitivität (s. Abb. 25 und 26) noch in ihrer Aktivierbarkeit durch Menthol, Kälte (s. Abb. 26) und Icilin (Daten zu Icilin nicht gezeigt) einen Unterschied zur Negativ-Kontrolle (nur mit dem Vektorplasmid transfizierte HEK-293-Zellen).

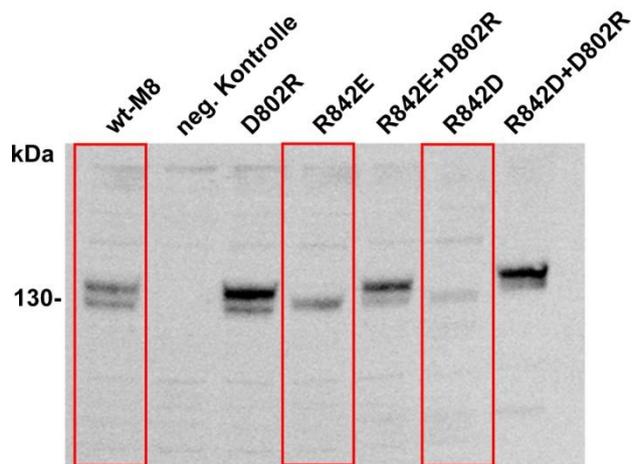
Eine als Ursache in Frage kommende, fehlende Oberflächenexpression der TRPM8-Mutanten wurde mittels Western-Blot-Analyse der Plasmamembranfraktionen ausgeschlossen. Beide Kanalvarianten zeigen im Western-Blot im Bereich von 130 kDa eine Bande. Im Unterschied zu wt-TRPM8 fehlt jedoch die oberste Bande, welche das vollständig glykosylierte Kanalprotein repräsentiert (s. Abb.27).



**Abb. 25:** Repräsentative Strom-Spannungskurven von wt-TRPM8 im Vergleich zu der TRPM8-Kanalvariante R842D. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in der Whole-Cell-Konfiguration mittels einer, wie im Methodenteil beschriebenen, Spannungsrampe von -150 mV bis +150 mV (s. Kap. 3.2.2.10 / Abb. 8). Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen bei den gemessenen Stromamplituden.



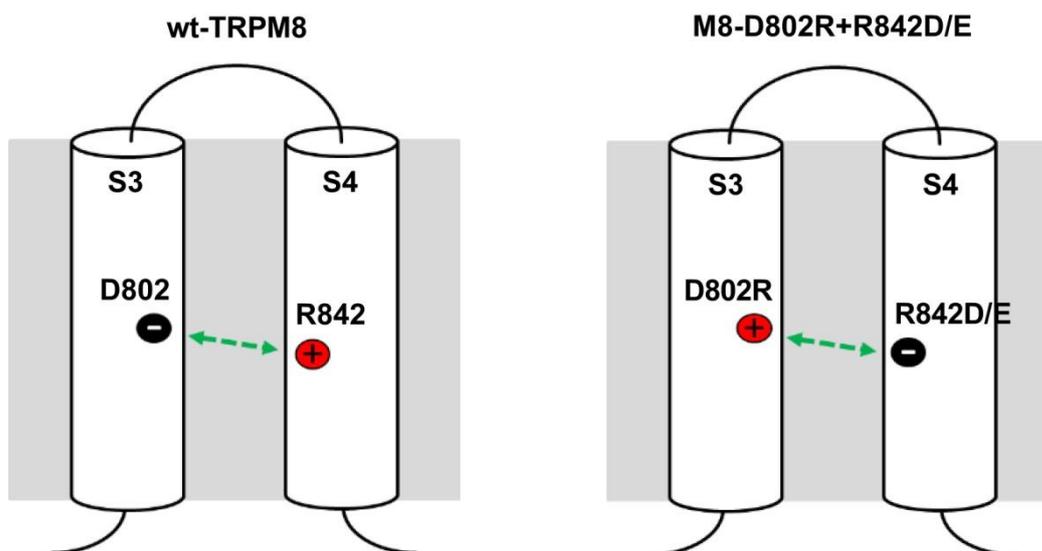
**Abb. 26:** Links: I/V-Kurven von wt-TRPM8, M8-R842D und M8-R842E. Die Messungen wurden, wie in Kap. 3.2.2.10 / Abb. 8 beschrieben, durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 8$  unabhängige Experimente) der Messwerte im Spannungsbereich zwischen 0 mV bis +150 mV. Rechts: Aktivierbarkeit der TRPM8-Kanalvarianten M8-R842D und M8-R842E durch Menthol- (200  $\mu$ M) und Kälte-Stimulation (10°C) im Vergleich zu wt-TRPM8. Gezeigt werden die resultierenden Einwärts-Ströme der TRPM8-Kanalvarianten nach Kälte- oder Menthol-Stimulation, bei einem Haltepotential von -60 mV genormt auf die jeweilige Zellmembranfläche (pA/pF). Jede Säule zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n \geq 8$  unabhängigen Experimenten. Werte mit \*\*\* werden mit  $p < 0.001$  als sehr signifikant angenommen.



**Abb. 27:** Western-Blot-Analyse der Plasmamembranfraktionen von wt-TRPM8, M8-R842E und M8-R842D exprimierenden HEK-293-Zellen sowie von nur mit dem Vektorplasmid transfizierten HEK-293-Zellen als Negativ-Kontrolle. Im Gegensatz zu wt-TRPM8 fehlt den TRPM8-Kanalvarianten R842E und R842D die obere Bande der vollständig glykosylierten und somit ausgereiften Form.

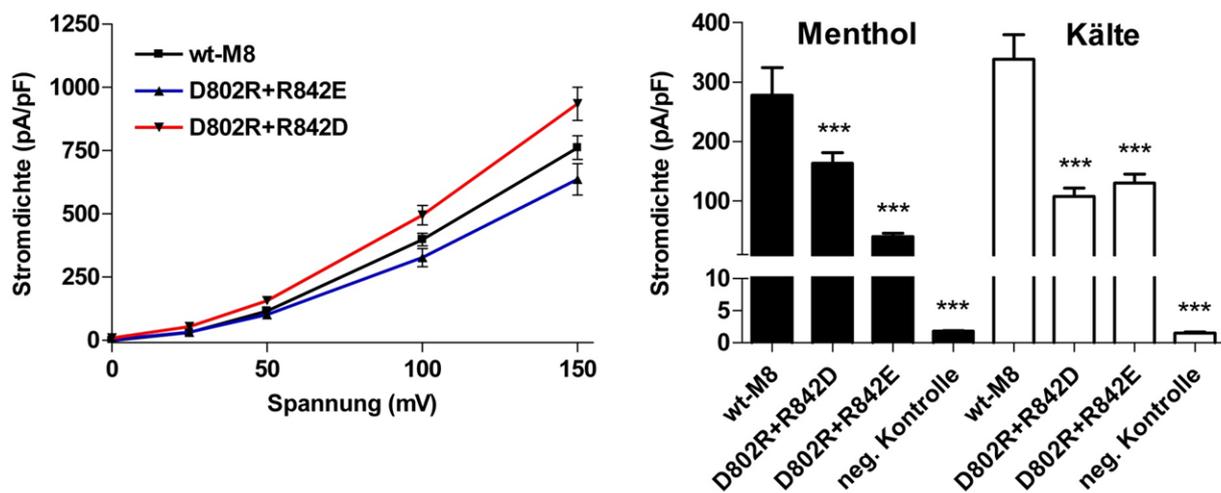
#### 4.4.2 Analyse der S3/S4-Doppel-Ladungsmutante M8-D802R+R842D

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich durch die Ladungsumkehr an Position D802 (M8-D802R) die von Pedretti et al. (2011) postulierte elektrostatische Interaktion zwischen S3 und S4 wiederherstellen lässt, um den Funktionsverlust der S4-Mutanten M8-R842D und M8-R842E auszugleichen. Die entsprechenden TRPM8-Kanalmutanten M8-D802R+R842D und M8-D802R+R842E wurden dafür mittels Whole-Cell-Patch-Clamp-Messungen funktionell charakterisiert. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung der Oberflächenexpression sowie der posttranslationalen Modifikation dieser TRPM8-Kanalvarianten mittels Western-Blot-Analyse (s. Kap. 3.4.5).



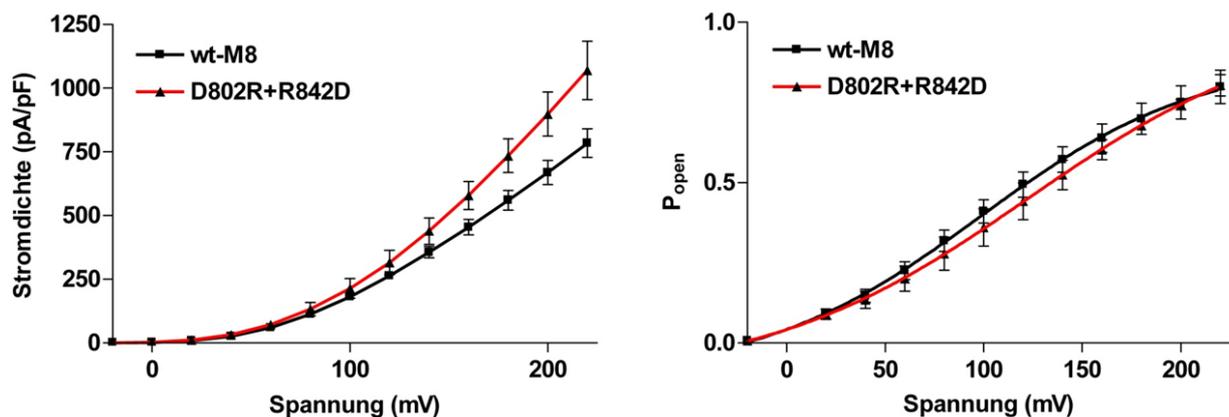
**Abb. 28:** Modell möglicher elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den Transmembrandomänen S3 und S4 von wt-TRPM8 im Vergleich mit M8-D802R+R842D/E. Elektrische Anziehungskräfte zwischen entgegengesetzten Ladungen sind durch grüne Doppelpfeile gekennzeichnet.

Der jeweilige Ladungsaustausch zwischen den potentiellen Interaktionspartnern, den Aminosäureresten D802 der Transmembrandomäne S3 und R842 der S4 (M8-D802R+R842D und M8-D802R+R842E) führt bis auf die Icilinsensitivität zur weitgehenden Wiederherstellung der Wildtyp-Funktion. Besonders interessant sind dabei die geringfügigen Unterschiede in der Spannungssensitivität zwischen wt-TRPM8 und den beiden TRPM8-Kanalvarianten M8-D802R+R842D sowie M8-D802R+R842E (s. Abb. 29). Denn trotz einer Ladungsumkehrmutation des Aminosäurerestes R842, einer von zwei essentiellen basischen Aminosäureresten des von Voets et al. (2007) postulierten Spannungssensors, zeigen M8-D802R+R842D und M8-D802R+R842E nahezu wildtypische I/V-Kurven sowie nur geringfügig abweichende Kurven der relativen Offenwahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der Spannung (gezeigt für M8-D802R+R842D, Abb. 30).

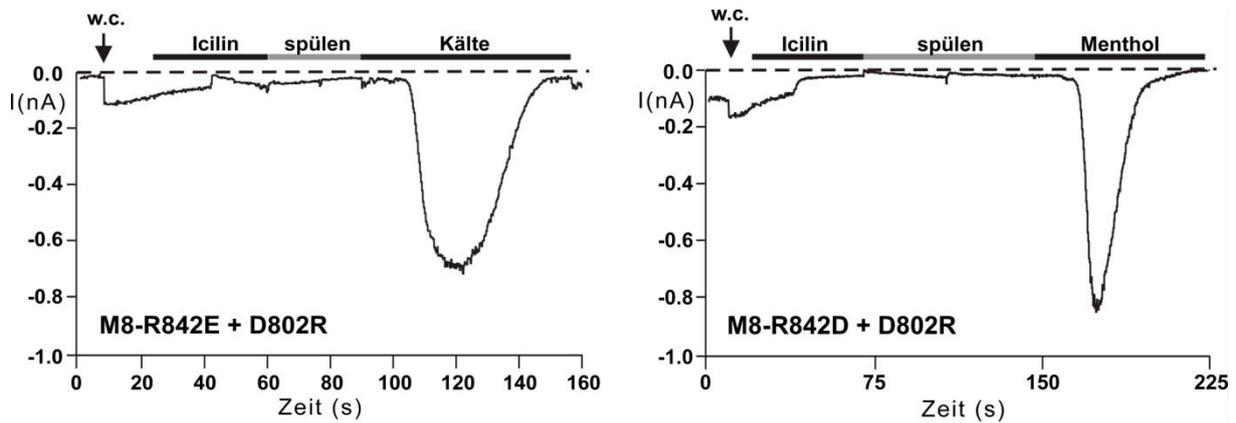


**Abb. 29:** Links: I/V-Kurven und Aktivierbarkeit der TRPM8-Kanalvarianten M8-D802R+R842D und M8-D802R+R842E durch Menthol- (200  $\mu$ M) und Kälte-Stimulation (10°C) im Vergleich zu wt-TRPM8. Die I/V-Messungen erfolgten mittels Spannungsrampen im Bereich von -150 mV bis +150 mV (s. Kap. 3.2.2.10 / Abb. 8) bei Raumtemperatur. Die gemessenen Stromdichten wurden anschließend auf die Membranfläche der jeweiligen HEK-293-Zelle (Kapazität der Zelle) normiert. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n \geq 8$  unabhängigen Experimenten. Rechts: Im rechten Diagramm werden die bei einem Haltepotential von -60 mV gemessenen Einwärts-Ströme der verschiedenen TRPM8-Kanalvarianten nach Kälte- oder Menthol-Stimulation gezeigt. Die Einwärtsströme wurden auf die jeweilige Zellmembranfläche (pA/pF) normiert. Jede Säule zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n \geq 8$  unabhängigen Experimenten. Werte mit \*\*\* werden mit  $p < 0.001$  als sehr signifikant angenommen.

Ähnlich wie bei der Spannungssensitivität wird auch die bei M8-R842D und M8-R842E erzeugte Unempfindlichkeit gegenüber Kälte- und Mentholstimulation jeweils durch die zusätzliche Ladungsumkehrmutation D802R weitgehend aufgehoben. Die Kältesensitivität der beiden TRPM8-Kanalvarianten M8-D802R+R842D und M8-D802R+R842E unterscheidet sich nur geringfügig, ist aber im Vergleich zu wt-TRPM8 deutlich verringert (s. Abb. 29). Im Gegensatz dazu wird die Mentholsensitivität der Doppel-Ladungsumkehrmutante M8-D802R+R842D bzw. M8-D802R+R842E unterschiedlich stark wiederhergestellt. M8-D802R+R842D zeigt dabei eine deutlich höhere Mentholsensitivität im Vergleich zu M8-D802R+R842E mit einem ca. 4-fach erhöhten Ansprechverhalten gegenüber Stimulation durch Menthol (s. Abb. 29). Dieses Ergebnis wird möglicherweise durch die unterschiedliche Länge der Seitenketten bei den sauren Resten hervorgerufen.

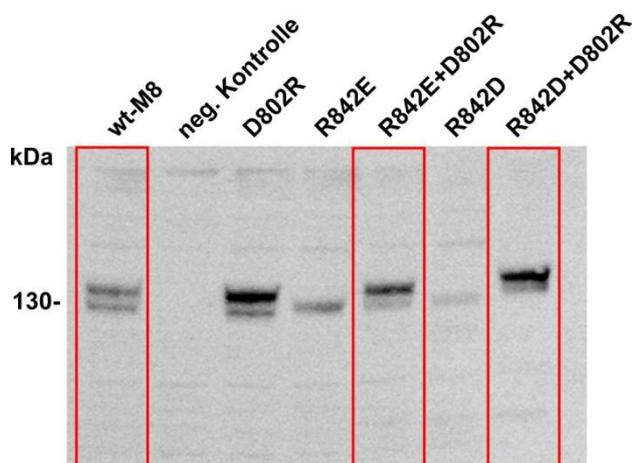


**Abb. 30:** I/V-Kurve und relative Offenwahrscheinlichkeiten ( $P_{\text{open}}$ ) der TRPM8-Kanalvariante M8-D802R+R842D im Vergleich zu wt-TRPM8. Die I/V-Messungen erfolgten mittels des Spannungsstufenprotokolls 1 (SSP1, stufenweise Depolarisation in 20 mV-Schritten von -60 mV bis +220 mV, s. Kap. 3.2.2.11 / Abb. 9) bei 30°C. Die dabei gemessenen Auswärtsströme wurden auf die Membranfläche (Kapazität der Zelle) der jeweiligen HEK-293-Zelle normiert. Die  $P_{\text{open}}$ -Werte sind definiert als  $G/G_{\text{max}}$  bei der jeweils angelegten Spannung.  $G$  ist dabei die elektrische Leitfähigkeit ( $I/U$ ) der Zellmembran während der jeweiligen Depolarisationsstufen (-20 mV bis +220 mV),  $G_{\text{max}}$  die maximale elektrische Leitfähigkeit bei starker Depolarisation (160 mV bis 180 mV) in Anwesenheit einer hohen Mentholkonzentration (200  $\mu\text{M}$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 5$  unabhängige Experimente) im Spannungsbereich zwischen -20 mV bis +220 mV, wobei diese im rechten Diagramm mit einer Boltzmann-Funktion (s. Kap. 3.5) gefittet wurden.



**Abb. 31:** Repräsentative Whole-Cell-Patch-Clamp-Messungen von M8-D802R+R842E und M8-D802R+R842D exprimierenden HEK-293-Zellen. Die Messungen erfolgten, wie im Methodenteil (s. Kap. 3.2.2.6) beschrieben, bei einem Haltepotential von -60 mV bei Raumtemperatur. Nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration (w.c.) wurden die Stimuli (30  $\mu$ M Icilin gefolgt von 10°C Kälte oder 100  $\mu$ M Menthol) sequenziell appliziert. Zwischen den Stimulationen fand jeweils ein Waschschritt mit Standard Badpuffer bei Raumtemperatur statt.

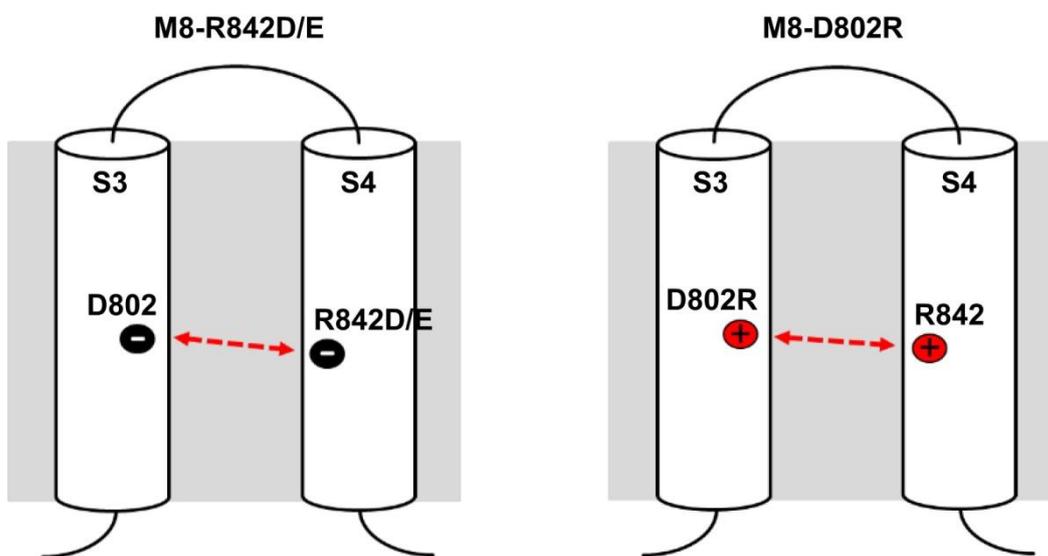
Neben der funktionellen Charakterisierung mittels Patch-Clamp-Analyse wurde auch die Oberflächenexpression sowie die posttranslationale Modifikation durch Glykosylierung der Doppel-Ladungsumkehrmutanten M8-D802R+R842D und M8-D802R+R842E untersucht. Im Unterschied zu den Einfach-Ladungsumkehrmutanten M8-R842D bzw. M8-R842E, die im Western-Blot nur durch die Bande der nicht bzw. unvollständig glykosylierten Kanalproteine repräsentiert werden, zeigen die Mutanten M8-D802R+R842D und M8-D802R+R842E die TRPM8 typischen Doppelbanden im Bereich von 130 kDa. Ein Unterschied zu wt-TRPM8 sowohl bei M8-D802R+R842D als auch bei M8-D802R+R842E besteht in der deutlich stärkeren Ausprägung der obersten Bande (s. Abb. 32).



**Abb. 32:** Western-Blot-Analyse der Plasmamembranfraktionen von wt-TRPM8, M8-D802R+R842D und M8-D802R+R842E exprimierenden HEK-293-Zellen sowie von Vektortransfizierten Kontrollzellen. Die Oberflächenexpression sowie der Glykosylierungsstatus von wt-TRPM8, M8-D802R+R842D und M8-D802R+R842E werden durch die für TRPM8 typischen Doppel-Banden im Bereich von 130 kDa im Western-Blot repräsentiert.

#### 4.4.3 Funktionelle Analyse der S3-Ladungsmutante M8-D802R

Bei der Mutation M8-D802R handelt es sich, wie bei den Mutationen M8-R842D bzw. M8-R842E, um eine Ladungsumkehrmutation, die eine mögliche positive elektrostatische Interaktion zwischen den Transmembrandomänen S3 und S4 unterbinden sollte. Um zu überprüfen, ob der beobachtete Funktionsverlust der Mutanten M8-R842D bzw. M8-R842E durch Verlust dieser spezifischen elektrostatischen Interaktion ausgelöst wurde, wurde neben den Doppel-Ladungsumkehrmutationen M8-D802R+R842D bzw. M8-D802R+R842E auch die TRPM8-Kanalvariante M8-D802R analysiert. Die funktionelle Charakterisierung von M8-D802R erfolgte mittels Patch-Clamp-Analyse.

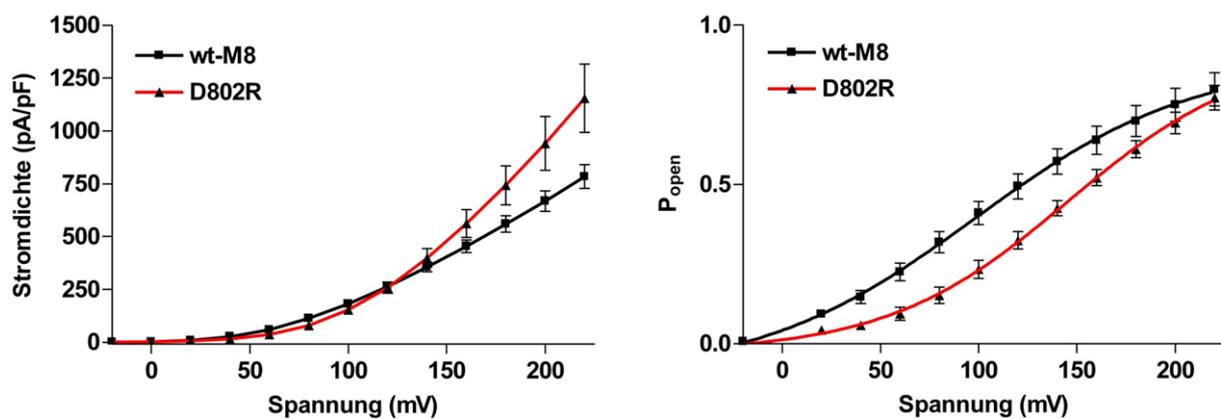


**Abb. 33:** Modell möglicher elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den Transmembrandomänen S3 und S4 von M8-R842D bzw. M8-R842E im Vergleich mit M8-D802R. Elektrische Abstoßungskräfte zwischen gleichen Ladungen sind durch rote Doppelpfeile gekennzeichnet.

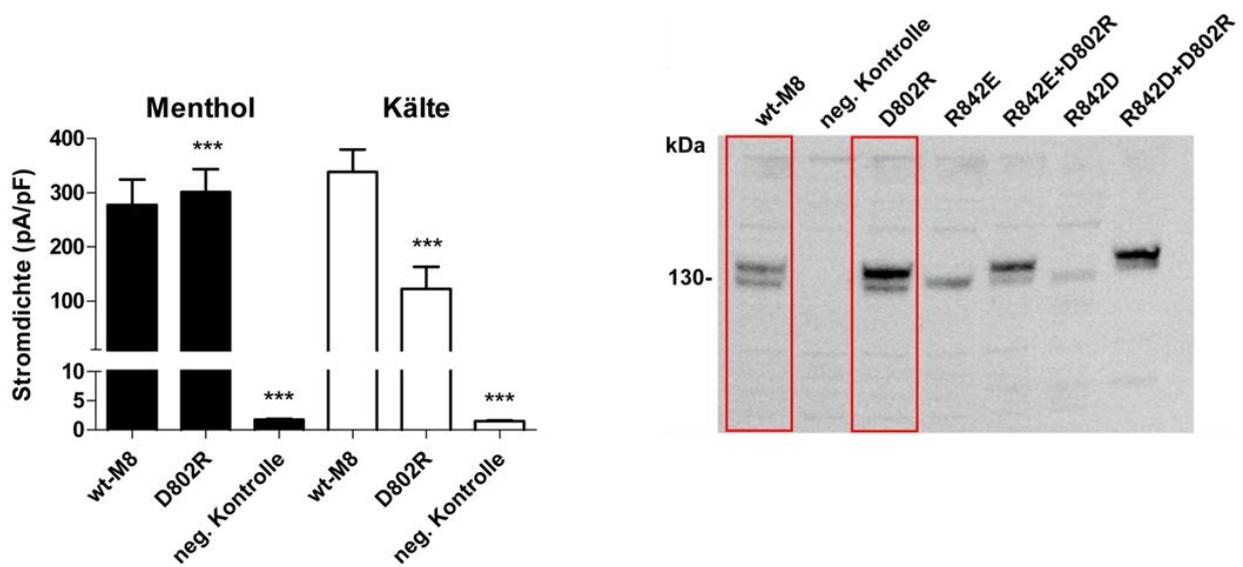
Im Gegensatz zu den Mutationen M8-R842E bzw. M8-R842D verursacht die Mutation M8-D802R überraschenderweise keine wesentlichen funktionellen Ausfälle, mit Ausnahme der bereits beschriebenen Unempfindlichkeit der S4-Mutanten gegenüber Icilin. Eine elektrostatische Anziehung der Transmembransegmente S3 und S4 bzw. der Aminosäurereste R802 und R842 in M8-D802R ist dabei ebenso unwahrscheinlich wie zwischen D802 und D/E842 in M8-R842D bzw. M8-R842E. Dennoch ist die TRPM8-Kanalvariante M8-D802R sowohl spannungs-, kälte- als auch mentholsensitiv (s. Abb. 34 und 35). Einzig die Icilinsensitivität ist, wie bei den Sensor modul-Mutanten beschrieben, nicht vorhanden, wie es aufgrund des

Aminosäureaustausches in einem für die Icilinsensitivität hochsensiblen Sequenzabschnittes zu erwarten war (Chuang et al., 2004).

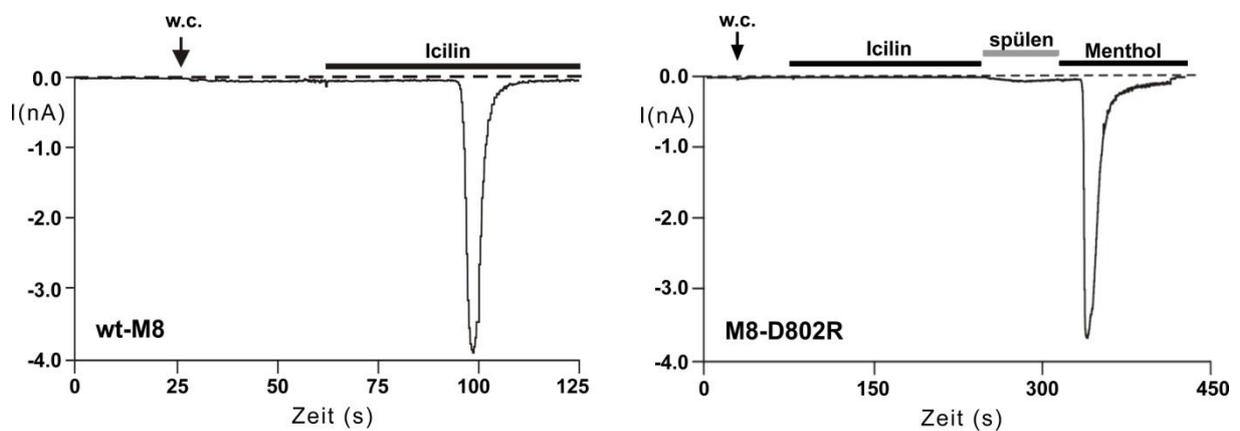
Im Detail zeigt die I/V-Kurve von M8-D802R die TRPM8-typische Auswärtsrektifizierung. Die Kurve der relativen Offenwahrscheinlichkeit ( $P_{\text{open}}$ ) in Abhängigkeit von der Spannung ist im Vergleich zu wt-TRPM8 deutlich nach rechts verschoben, mit nahezu identischen Werten bei 220 mV Depolarisation (s. Abb. 34). Die Unterschiede in der Mentholsensitivität sind im Vergleich zu wt-TRPM8 gering (s. Abb. 35), die Kältesensitivität dagegen ist um etwa 2/3 verringert. Die mittels Western-Blot-Analyse überprüfte N-Glykosylierung, ebenso wie die Oberflächenexpression der Mutante M8-D802R, ist nahezu wildtypisch. Einziger Unterschied zu wt-TRPM8 ist eine stärker ausgeprägte, obere Bande der vollständig gereiften Kanalproteine (s. Abb. 35).



**Abb. 34:** I/V-Kurve und relative Offenwahrscheinlichkeiten ( $P_{\text{open}}$ ) der TRPM8-Kanalvariante M8-D802R im Vergleich zu wt-TRPM8. Die I/V-Messungen sowie die Berechnungen der  $P_{\text{open}}$ -Werte wurden wie in Kap. 3.2.2.7 beschrieben durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 6$  unabhängige Experimente) im Spannungsbereich zwischen -20 mV bis +220 mV, wobei diese im rechten Diagramm mit einer Boltzmann-Funktion (s. Kap. 3.5) gefittet wurden.



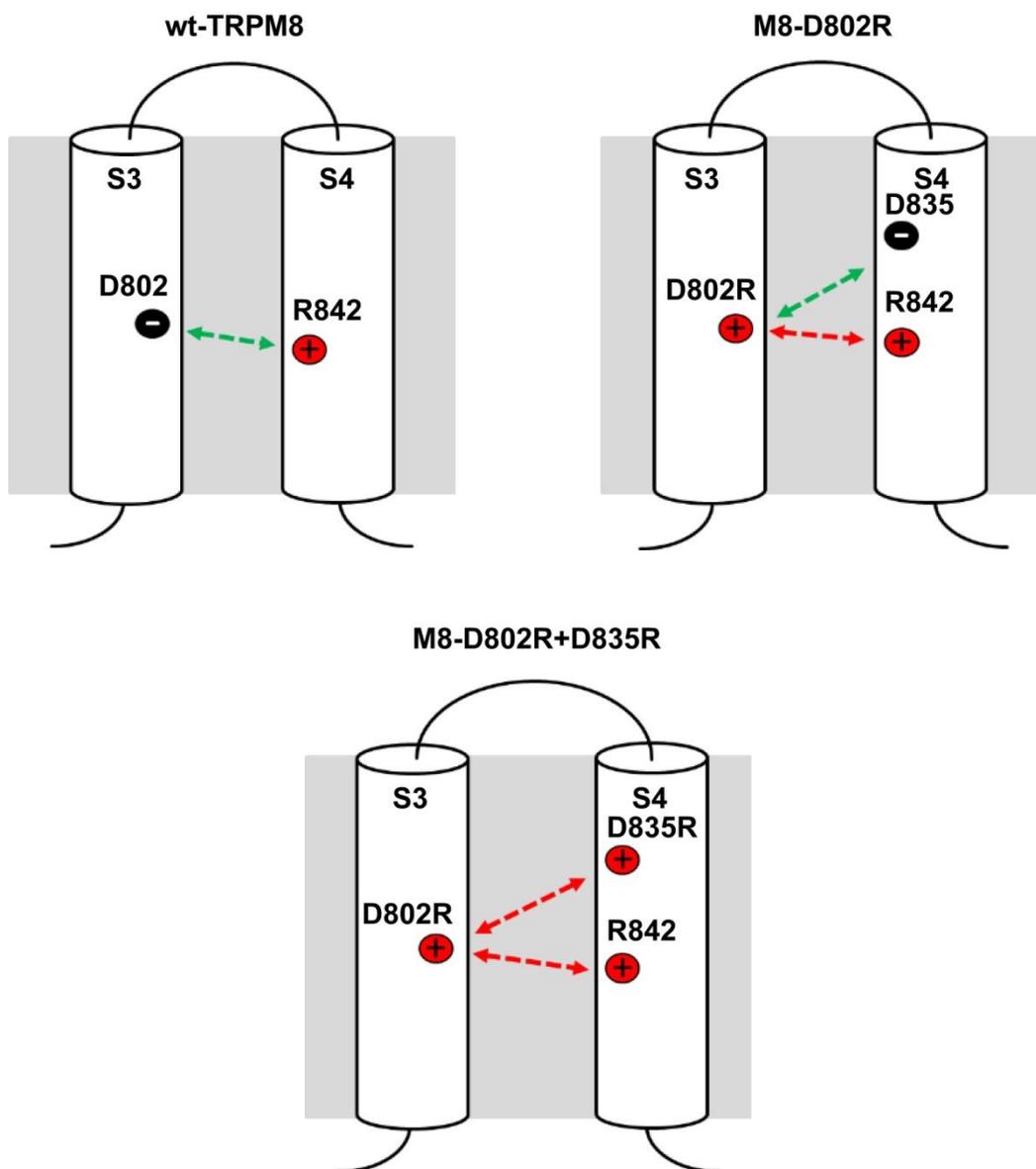
**Abb. 35:** Links: Aktivierbarkeit der TRPM8-Kanalvariante M8-D802R durch Menthol- (200  $\mu$ M) und Kälte-Stimulation (10°C) im Vergleich zu wt-TRPM8. Gezeigt werden die durchschnittlichen Einwärts-Ströme nach Kälte- oder Menthol-Stimulation bei einem Haltepotential von -60 mV genormt auf die jeweilige Zellmembranfläche (pA/pF). Jede Säule zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n \geq 8$  unabhängigen Experimenten. Werte mit \*\*\* werden mit  $p < 0.001$  als sehr signifikant angenommen. Rechts: Western-Blot der Plasmamembranfraktionen von wt-TRPM8 und M8-D802R exprimierenden HEK-293-Zellen sowie von nur Vektor transfizierten HEK-293-Zellen als Negativkontrolle.



**Abb. 36:** Repräsentative Whole-Cell-Patch-Clamp Messungen von wt-TRPM8 und M8-D802R exprimierenden HEK-Zellen. Die Messungen erfolgten, wie im Methodenteil (Kap. 3.2.2.6) beschrieben, bei einem Haltepotential von -60 mV bei Raumtemperatur. Nach dem Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration (w.c.) wurde bei wt-TRPM8 mit 30  $\mu$ M Icilin und im Falle von M8-D802R sequenziell mit 30  $\mu$ M Icilin gefolgt von 100  $\mu$ M Menthol stimuliert. Zwischen den Stimulationen fand ein Waschschritt mit Standard-Badpuffer bei Raumtemperatur statt.

#### 4.4.4 Gibt es für D802R einen elektrostatischen Interaktionspartner innerhalb der Transmembrandomäne S4?

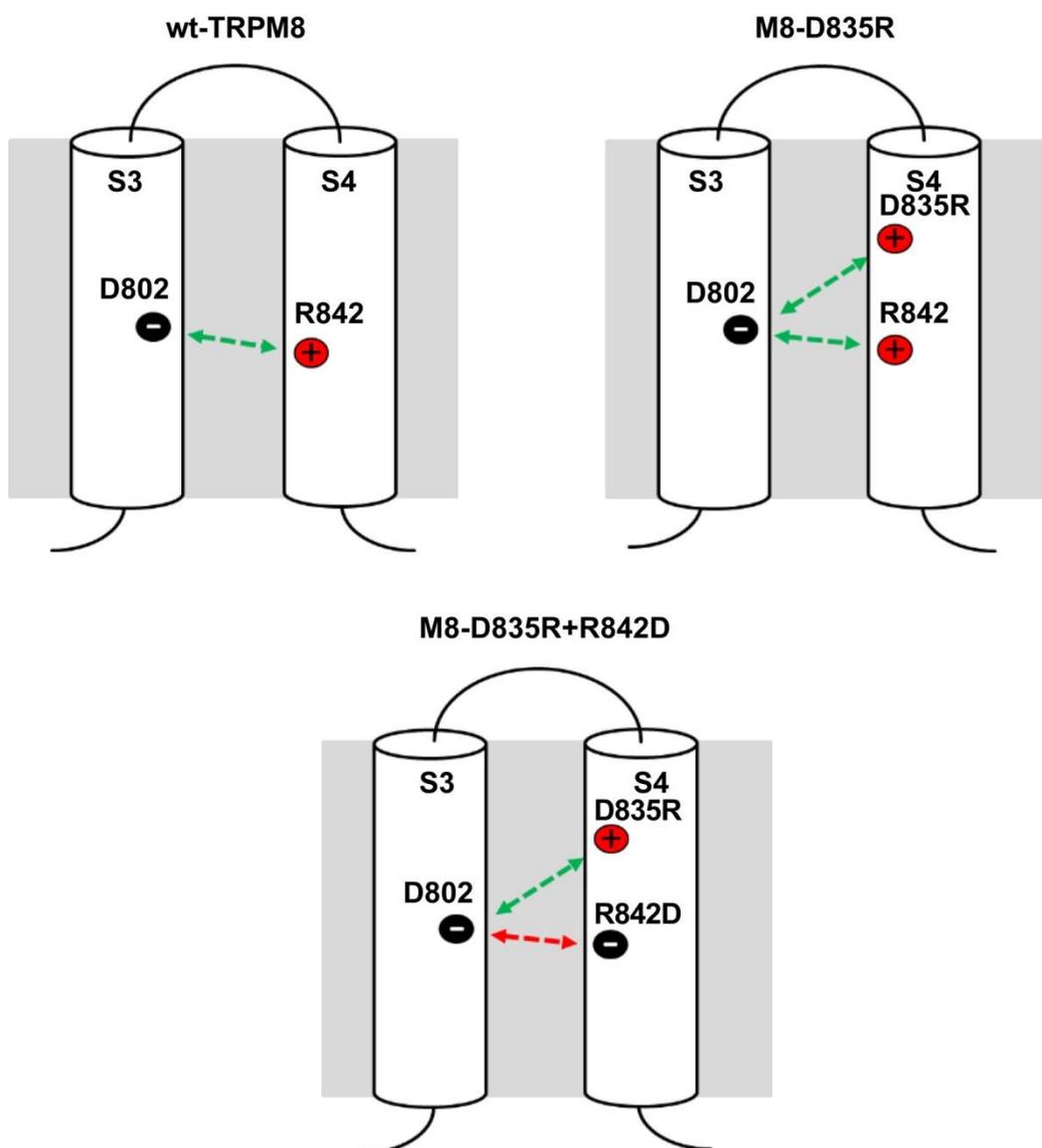
Eine positive elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Aminosäureresten R802 und R842 in der funktionalen TRPM8-Mutante M8-D802R ist ebenso ausgeschlossen wie zwischen den Aminosäureresten D802 und D842 bzw. E842 in den nicht funktionellen Mutanten M8-R842D und M8-R842E, was die Frage nach der Ursache für die unterschiedliche Aktivierbarkeit eröffnet.



**Abb. 37:** Modell möglicher elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den Transmembrandomänen S3 und S4 von wt-TRPM8 im Vergleich mit M8-D802R und M8-D802R+D835R. Elektrische Anziehungskräfte zwischen entgegengesetzten Ladungen sind durch grüne Doppelpfeile, elektrische Abstoßungskräfte zwischen gleichen Ladungen durch rote Doppelpfeile gekennzeichnet.

Eine mögliche Erklärung könnte das Vorliegen einer kompensatorischen, positiven elektrostatischen Wechselwirkung mit einem alternativen Bindungspartner im S4-Segment bei M8-D802R sein. Der einzige diesbezüglich in Frage kommende elektrostatische Interaktionspartner von R802 ist der zentral in der Transmembrandomäne S4 lokalisierte saure Aminosäurerest D835.

Eine hypothetische positive Wechselwirkung zwischen R802 und D835 sollte durch die Mutation D835R verhindert werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Doppel-Ladungsumkehrmutante M8-D802R+D835R funktionell mittels Patch-Clamp analysiert.

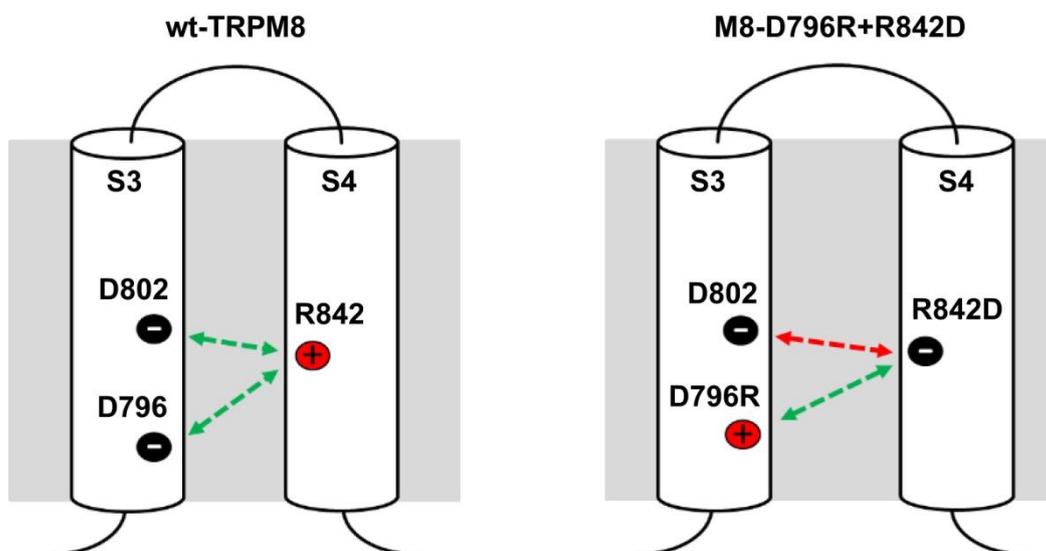


**Abb. 38:** Modell möglicher elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den Transmembrandomänen S3 und S4 von wt-TRPM8 im Vergleich mit M8-D835R und M8-D835R+R842D. Elektrische Anziehungskräfte zwischen entgegengesetzten Ladungen sind durch grüne Doppelpfeile, elektrische Abstoßungskräfte zwischen gleichen Ladungen durch rote Doppelpfeile gekennzeichnet.

Wie erwartet zeigte diese Mutante einen kompletten Funktionsverlust (Daten nicht gezeigt). Dennoch konnte die Annahme einer alternativen positiven elektrostatischen Wechselwirkung zwischen R802 und D835 nicht abschließend bewiesen werden, da auch die Kontrollmutationen M8-D835R sowie M8-D835R+R842D zu einem kompletten Funktionsverlust von TRPM8 führen (Daten nicht gezeigt).

Die Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression sowie der posttranslationalen Modifikation der Mutanten M8-D835R, M8-D802R+D835R und M8-D835R+R842D zeigt bei allen dreien ein ähnliches Expressionsmuster, welches vergleichbar mit dem der beiden, ebenfalls nicht funktionalen Mutanten, M8-R842D bzw. M8-R842E ist. Alle diese Mutanten weisen im Western-Blot eine schwache Oberflächenexpression auf, aus nicht- sowie unvollständig-glykosyliertem Kanalprotein, während die Bande der vollständig glykosylierten Kanalproteine nicht nachweisbar ist (s. Abb.43).

#### 4.4.5 Gibt es für die Mutante M8-R842D einen zu D802R alternativen elektrostatischen Interaktionspartner in der Transmembrandomäne S3?

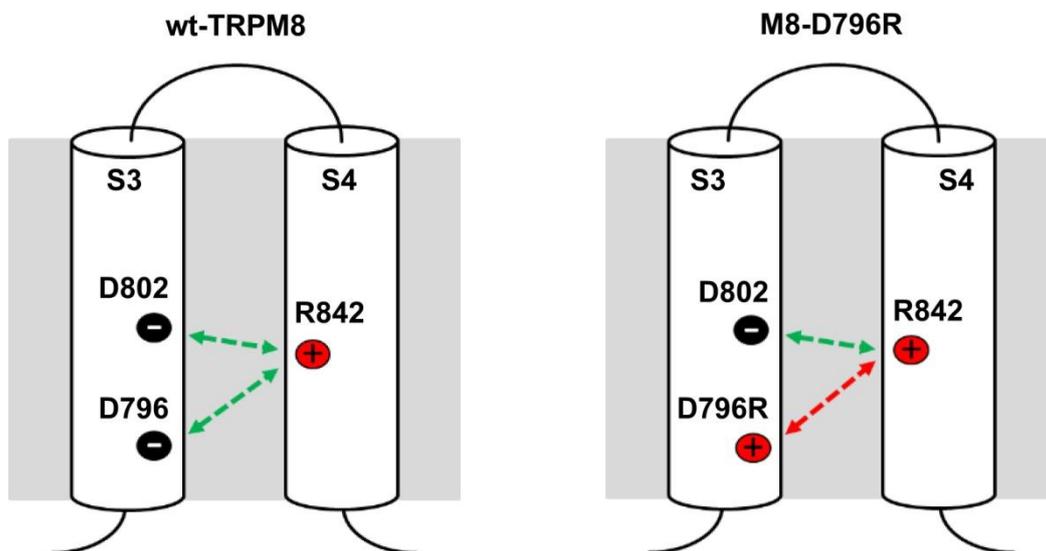


**Abb. 39:** Modell möglicher elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den Transmembrandomänen S3 und S4 von wt-TRPM8 im Vergleich mit M8-D796R+R842D. Elektrische Anziehungskräfte zwischen entgegengesetzten Ladungen sind durch grüne Doppelpfeile, elektrische Abstoßungskräfte zwischen gleichen Ladungen durch rote Doppelpfeile gekennzeichnet.

Innerhalb der Transmembrandomäne S3 von wt-TRPM8 ist neben D802 der Aminosäurerest D796 der einzige weitere, negativ geladene Aminosäurerest. Da sich diese beiden negativ geladenen Aminosäurereste in räumlicher Nähe zueinander befinden, ist möglicherweise der Aminosäurerest D796 ein weiterer, potentieller, positiv elektrostatischer Interaktionspartner

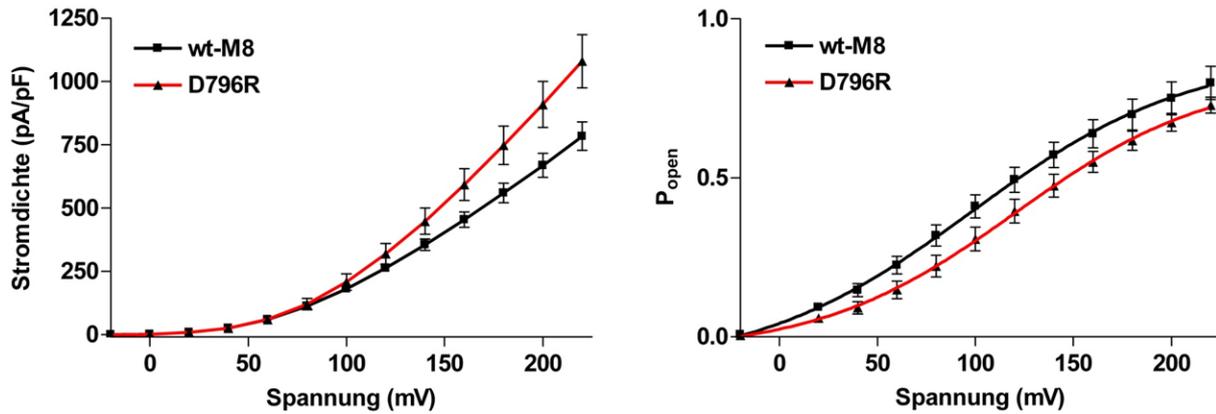
des basischen Aminosäurerestes R842 in der S4. Mit Hilfe der Doppel-Ladungsumkehrmutante M8-D796R+R842D wurde nun überprüft, ob auch die Ladungsumkehrmutation M8-D796R den Funktionsausfall der Mutation M8-R842D kompensieren kann.

Die mittels Patch-Clamp durchgeführte funktionelle Analyse der Doppel-Ladungsumkehrmutante M8-D796R+R842D zeigt, dass die Ladungsumkehrmutation M8-D796R im Gegensatz zur Ladungsumkehrmutation M8-D802R (s. Kap. 4.4.2) nicht den durch die Mutation M8-R842D bedingten Funktionsausfall ausgleicht. Für die Mutante M8-D796R+R842D lässt sich keinerlei Kanalfunktion nachweisen (Daten nicht gezeigt). Sie besitzt daher denselben Phänotyp wie die Einzelmutationen M8-R842D bzw. M8-R842E, die einen kompletten Funktionsverlust zeigen.

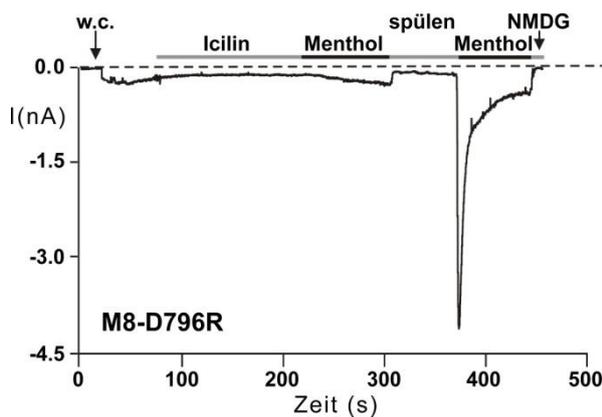


**Abb. 40:** Modell möglicher elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den Transmembrandomänen S3 und S4 von wt-TRPM8 im Vergleich mit M8-D796R. Elektrische Anziehungskräfte zwischen entgegengesetzten Ladungen sind durch grüne Doppelpfeile, elektrische Abstoßungskräfte zwischen gleichen Ladungen durch rote Doppelpfeile gekennzeichnet.

Die Kontrollmutation M8-D796R bildet ähnlich wie die Mutation M8-D802R einen funktionsfähigen spannungs-, kälte- und mentholsensitiven Kanal. Wie bei der Mutation M8-D802R führt auch die Mutation M8-D796R zu Unempfindlichkeit gegenüber Icilin sowie zu einer Rechtsverschiebung der Kurve der relativen Offenwahrscheinlichkeiten ( $P_{\text{open}}$ ) in Abhängigkeit von der Spannung (s. Abb.41).

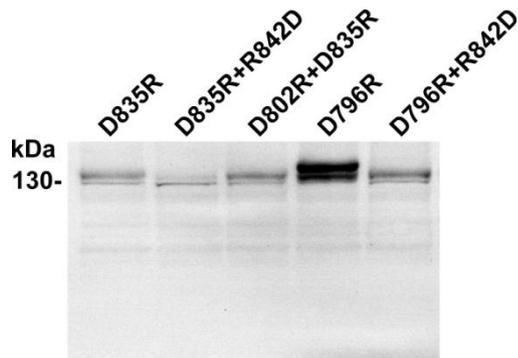


**Abb. 41:** I/V-Kurve und relative Offenwahrscheinlichkeiten ( $P_{\text{open}}$ ) der TRPM8-Kanalvariante M8-D796R im Vergleich zu wt-TRPM8. Die I/V-Messungen sowie die Berechnungen der  $P_{\text{open}}$ -Werte wurden, wie in Kap. 3.2.2.7 beschrieben, durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 6$  unabhängige Experimente) im Spannungsbereich zwischen -20 mV bis +220 mV, wobei diese im rechten Diagramm mit einer Boltzmann-Funktion (s. Kap. 3.5) gefittet wurden.



**Abb. 42:** Repräsentative Whole-Cell-Patch-Clamp Messung von einer M8-D796R exprimierenden HEK-Zelle. Die Messung erfolgte, wie im Methodenteil (Kap. 3.2.2.6) beschrieben, bei einem Haltepotential von -60 mV bei Raumtemperatur. Nach dem Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration (w.c.) fand eine Applikation von 30  $\mu\text{M}$  Icilin statt. Ohne einen Waschschrift wurde zusätzlich mit 200  $\mu\text{M}$  Menthol stimuliert, gefolgt von einem Waschschrift mit Standard-Badpuffer bei Raumtemperatur und wiederholter Stimulation durch 200  $\mu\text{M}$  Menthol. Die durch die zweite Mentholstimulation auftretenden Einwärtsströme wurden nach kurzer Zeit mit NMDG geblockt.

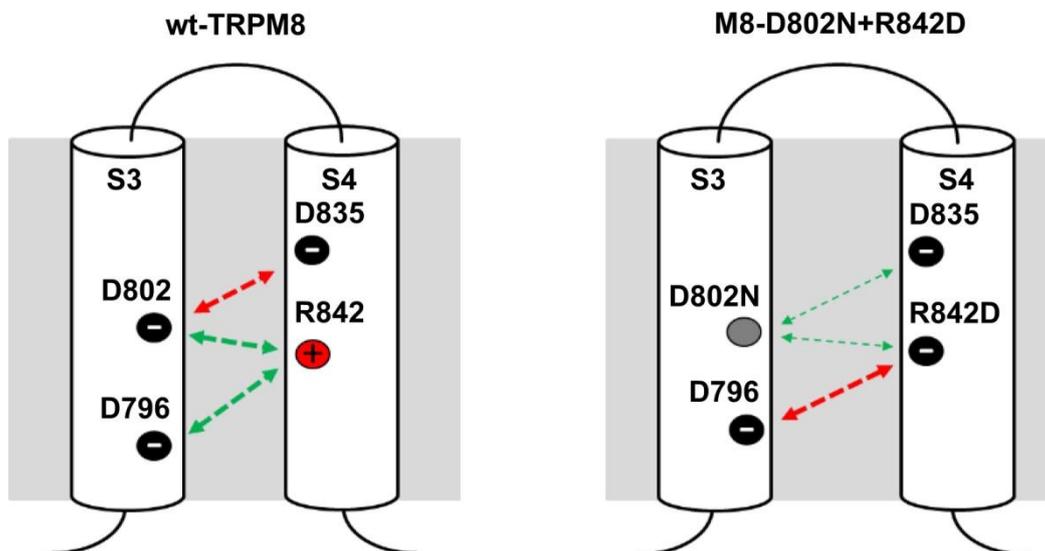
Neben der funktionellen Charakterisierung mittels Patch-Clamp-Analyse wurden auch die Oberflächenexpression sowie die posttranslationale Modifikation der Doppel-Ladungsumkehrmutante M8-D796R+R842D und der Kontrollmutante M8-D796R untersucht. Im Unterschied zur Doppel-Ladungsumkehrmutante M8-D796R+R842D, die im Western-Blot nur durch die Bande der nicht bzw. unvollständig glykosylierten Kanalproteine repräsentiert wird, zeigt die einfache Ladungsumkehrmutante M8-D796R im Western-Blot die für TRPM8 typischen Doppelbanden im Bereich von 130 kDa.



**Abb. 43:** Western-Blot der Plasmamembranfraktionen von M8-D835R, M8-D835R+R842D, M8-D802R+D835R, M8-D796R sowie M8-D796R+R842D exprimierenden HEK-293-Zellen. Bis auf die Mutante M8-D796R in Bahn 4 zeigen alle anderen Mutanten keine Bande der vollständig glykosylierten Kanalproteine.

#### 4.4.6 Funktionelle Analyse der TRPM8-Mutanten D802N+R842D

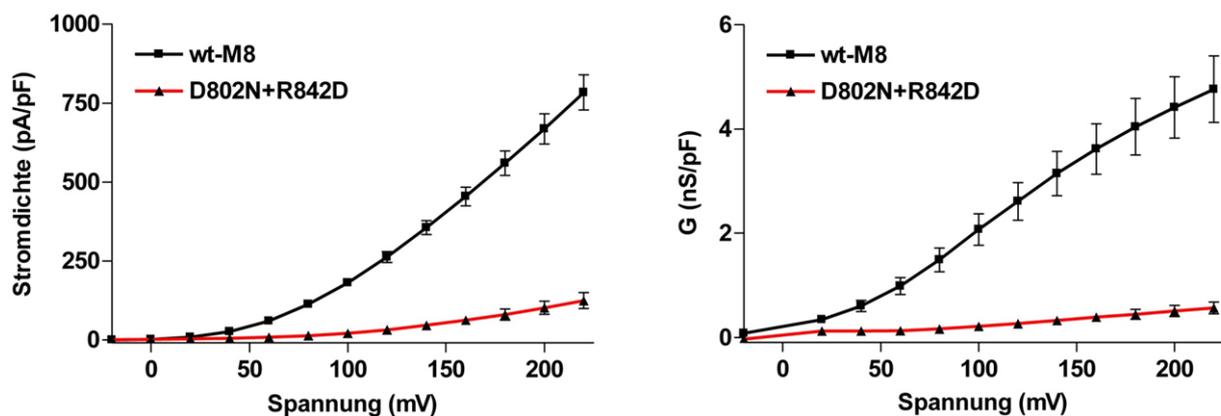
Die Neutralisationsmutation M8-D802N innerhalb des Sensormoduls der Transmembrandomäne S3 verändert im Vergleich zu wt-TRPM8 die Spannungs-, Kälte- und Mentholsensitivität gering und führt, wie bereits in Kap. 4.2.3 gezeigt, zu einer wildtypischen Glykosylierung und Oberflächenexpression. Die Kombination dieser funktionalen Neutralisationsmutation der S3 mit der Ladungsumkehrmutation M8-R842D der S4 sollte eine mögliche, positiv elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Transmembrandomänen S3 und S4 deutlich abschwächen.



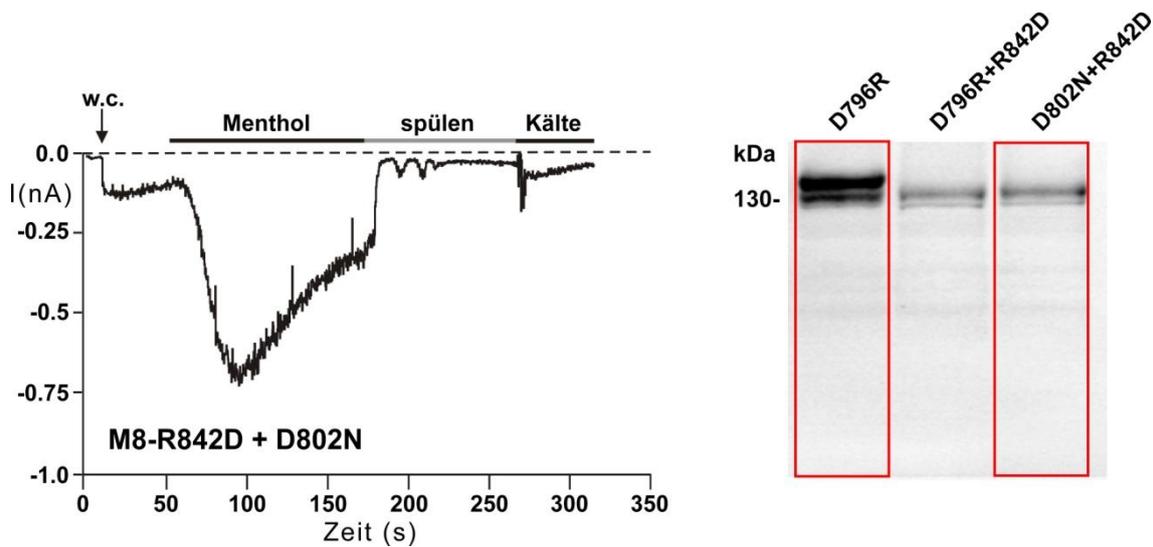
**Abb. 44:** Modell möglicher elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den Transmembrandomänen S3 und S4 von wt-TRPM8 im Vergleich mit M8-D802N+R842D. Elektrische Anziehungskräfte zwischen entgegengesetzten Ladungen sind durch grüne Doppelpfeile (die dünnen grünen Pfeile im rechten Schaubild repräsentieren mögliche, schwach elektrostatische Wechselwirkungen), elektrische Abstoßungskräfte zwischen gleichen Ladungen durch rote Doppelpfeile gekennzeichnet.

Die mittels Patch-Clamp durchgeführte funktionelle Analyse der TRPM8-Mutante M8-D802N+R842D zeigt, dass die Neutralisationsmutation M8-D802N im Gegensatz zur Ladungsumkehrmutation M8-D796R den Funktionsausfall der Mutation M8-R842D kompensieren kann, wenn auch wesentlich schwächer als M8-D802R. Sowohl die Spannungs-, Kälte- als auch die Mentholsensitivität sind im Vergleich mit wt-TRPM8 sehr stark reduziert (s. Abb. 45 und 46). Ebenso wie die Sensor modulmutante M8-D802N ist auch die Mutante M8-D802N+R842D unempfindlich gegenüber Stimulation durch Icilin. Neben den funktionellen Einschränkungen zeigte die TRPM8-Mutante M8-D802N+R842D auch im Vergleich zu wt-TRPM8 eine unvollständige Glykosylierung (s. Abb. 46).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dies ein weiterer Hinweis für die Bedeutung des Aminosäurerestes an Position 802 im Bezug auf die Funktionalität von TRPM8 ist.



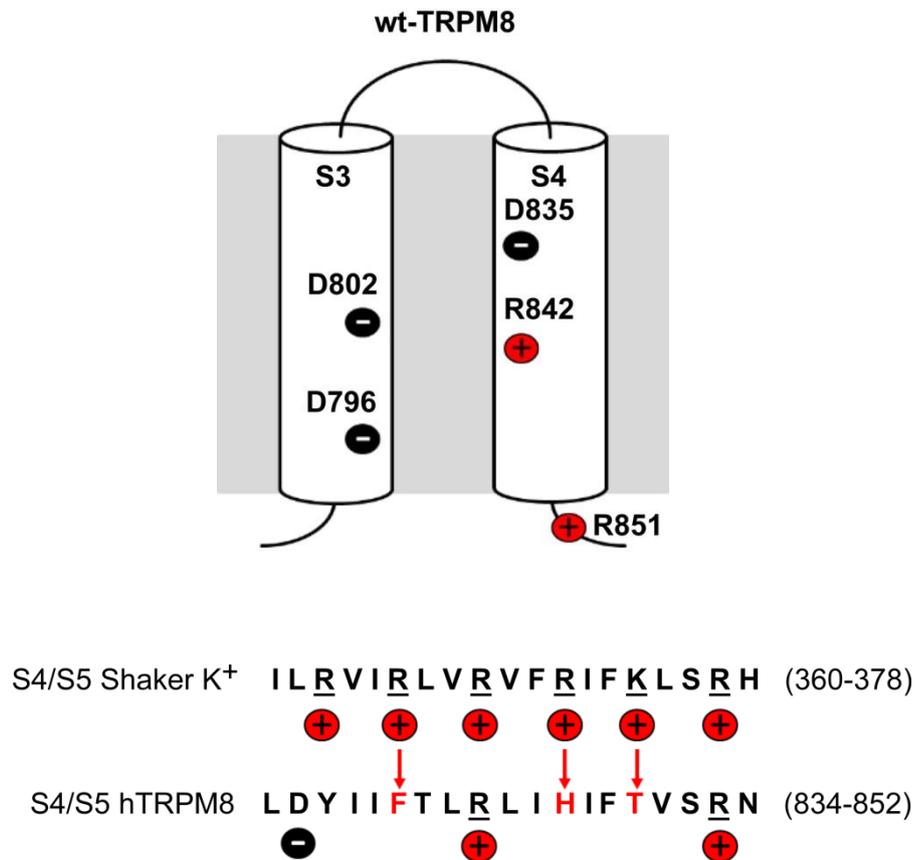
**Abb. 45:** I/V- und G/V-Kurven der TRPM8-Mutante M8-D802N+R842D im Vergleich zu wt-TRPM8. Die I/V-Messungen erfolgten mittels des Spannungsstufenprotokolls 1 (SSP1, stufenweise Depolarisation in 20 mV-Schritten von -60 mV bis +220 mV, s. Kap. 3.2.2.11 / Abb. 9) bei 30°C. Die Werte der elektrischen Leitfähigkeiten (G) in Abhängigkeit von der Spannung wurden aus den Daten der I/V-Messungen berechnet. In beiden Diagrammen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (6 - 9 unabhängige Experimente) im Spannungsbereich zwischen -20 mV bis +220 mV dargestellt. Die gemessenen Stromdichten sowie die daraus abgeleiteten, elektrischen Leitfähigkeiten wurden jeweils auf die Membranfläche der untersuchten HEK-293-Zelle (Kapazität der Zelle, pA/pF) normiert.



**Abb. 46:** Links: Repräsentative Whole-Cell-Patch-Clamp Messung einer M8-D802N+R842D exprimierenden HEK-Zelle. Die Messung erfolgte, wie im Methodenteil (s. Kap. 3.2.2.6) beschrieben, bei einem Haltepotential von -60 mV bei Raumtemperatur. Nach dem Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration (w.c.) wurde mit 200  $\mu$ M Menthol stimuliert, gefolgt von einem Waschschriff mit Standard-Badpuffer bei Raumtemperatur und anschließender Stimulation mit kaltem Standard-Badpuffer (10°C). Rechts: Western-Blot-Analyse der Plasmamembranfraktionen von M8-D796R und M8-D802N+R842D exprimierenden HEK-293-Zellen. Im Gegensatz zu M8-D796R mit einer wildtypischen Oberflächenexpression und Glykosylierung zeigt die Mutante M8-D802N+R842D nur die unteren Banden und damit unvollständig glykosylierte Kanalproteine.

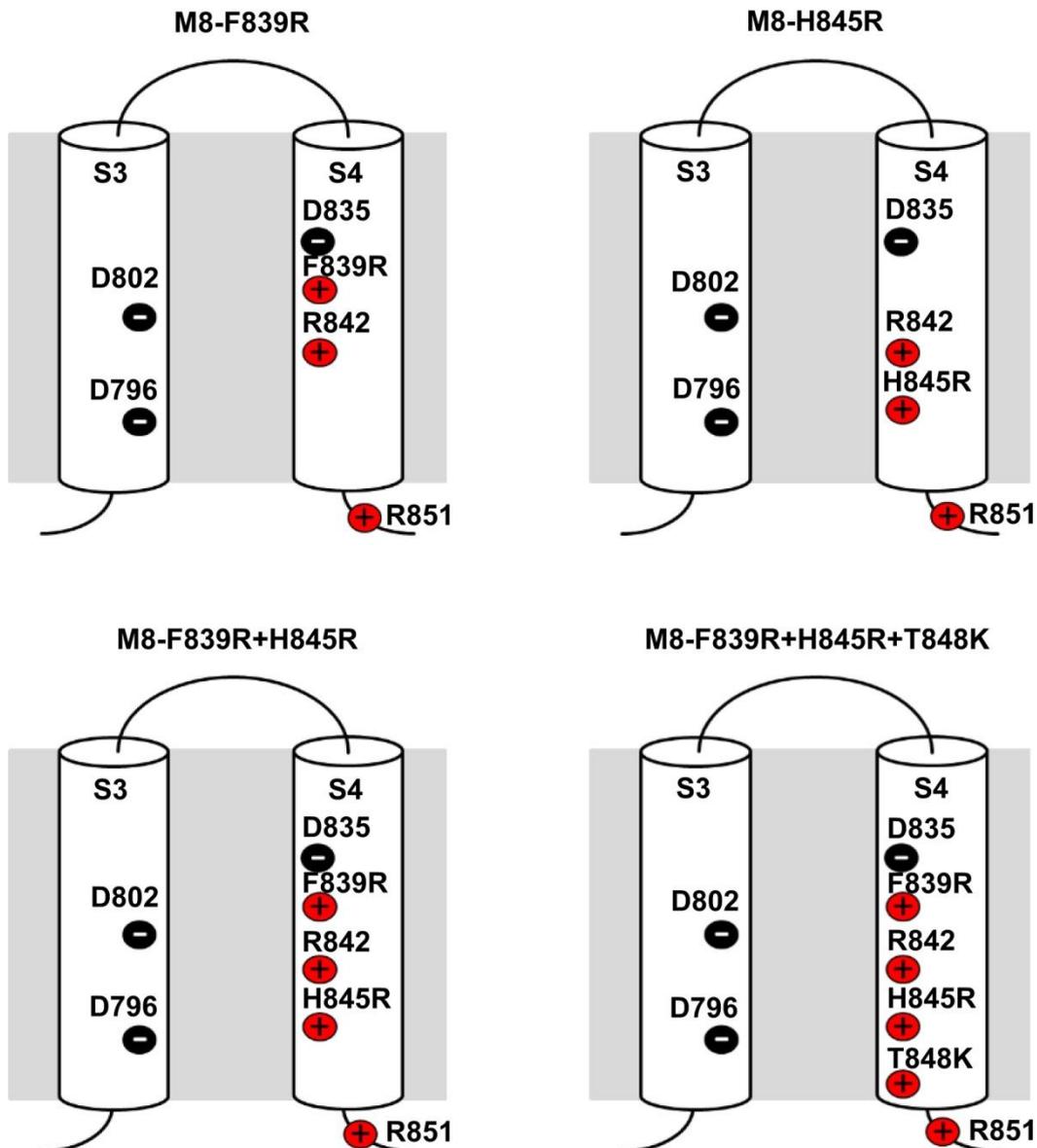
#### 4.5 Funktionelle Auswirkungen zusätzlicher, in das S4-Segment von TRPM8 eingebrachter positiver Ladungen

Die funktionelle Charakterisierung der TRPM8-Mutanten M8-D802R+R842D bzw. M8-D802R+R842E zeigt, dass eine Ladungsumkehr am zentralen S4-Arginin (R842) die Spannungssensitivität von TRPM8 grundsätzlich nicht verändert, wenn gleichzeitig die zusätzliche Ladungsumkehrmutation M8-D802R vorliegt (s. Kap. 4.4.2). Dieses Ergebnis widerspricht der Hypothese, dass die Transmembrandomäne S4 von TRPM8 wie ein klassischer Spannungssensor agiert. Die sich daraus ergebende Vermutung, dass das spannungsabhängige Schaltverhalten von TRPM8 durch einen, vom klassischen Modell abweichenden Mechanismus abläuft, sollte als Teil dieser Arbeit durch weitere Experimente untermauert werden. Zu diesem Zweck erfolgte eine funktionelle Charakterisierung der TRPM8-Varianten M8-F839R, M8-H845R, M8-F839R+H845R und M8-F839R+H845R+T848K. Diese Mutanten simulieren durch das Einfügen weiterer positiver Ladungen in S4 einen charakteristischen Spannungssensor, analog zu den Shaker  $K^+$ -Kanälen (s. Abb. 47).



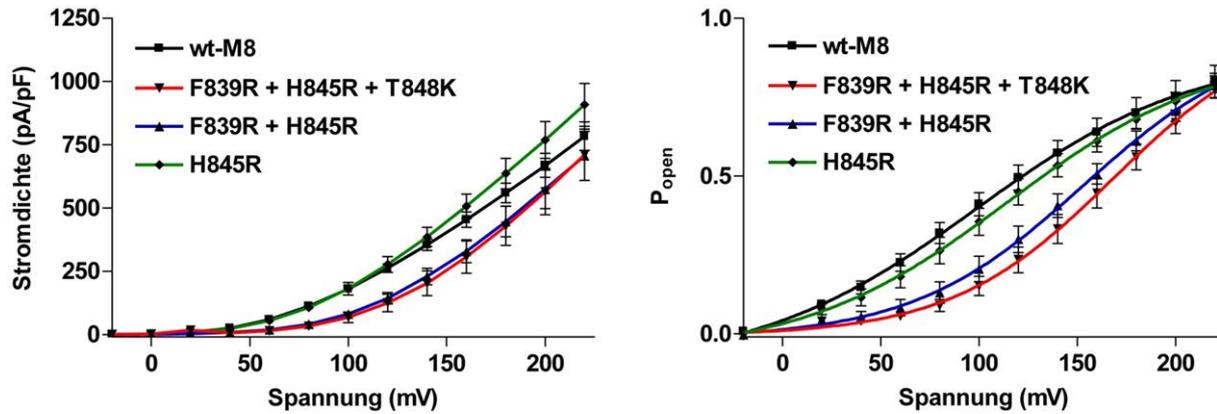
**Abb. 47:** Oben: Modell der Transmembrandomänen S3 und S4 von wt-TRPM8. Unten: Alignment der Aminosäuresequenz des S4-Spannungssensors von Shaker K<sup>+</sup> und der homologen Region innerhalb der S4/S5 des humanen TRPM8-Kanals. Die kritischen positiven Aminosäurereste sind unterstrichen dargestellt. In verschiedenen Mutationen wurden die rot markierten Aminosäurereste innerhalb der TRPM8-Sequenz in die entsprechenden Aminosäurereste von Shaker K<sup>+</sup> mutiert (s. Abb. 48).

Im Fall des klassischen Spannungssensormechanismus für TRPM8 wäre, durch das Einbringen von zusätzlichen positiven Ladungen in das S4-Segment eine Zunahme der Spannungssensitivität bzw. ein gesteigertes spannungsabhängiges Schaltverhalten in Abwesenheit von Menthol oder Kälte zu erwarten. Die bei einer Temperatur von ca. 30°C durchgeführten Spannungsstufenprotokolle zeigen jedoch, dass die Spannungsabhängigkeiten dieser S4-Mutanten im Vergleich zu wt-TRPM8 signifikant verringert sind. Interessanterweise nimmt die Spannungsabhängigkeit dabei mit steigender Anzahl an künstlich in das S4-Segment eingebrachten positiven Ladungen ab, was einen deutlichen Widerspruch zum Modell des klassischen Spannungssensors darstellt.



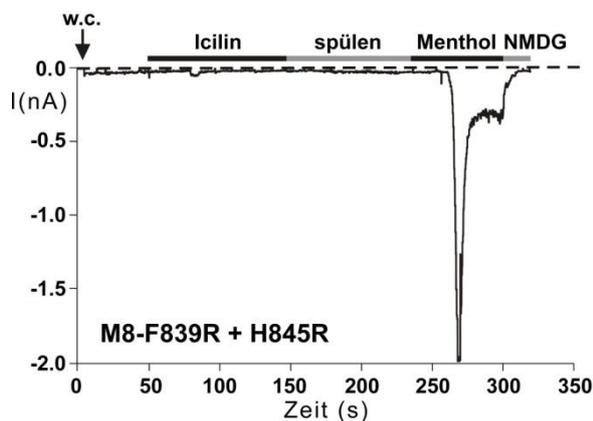
**Abb. 48:** Modell der Transmembrandomänen S3 und S4 der TRPM8-Spannungssensormutanten M8-F839R, M8-H845R, M8-F839R+H845R und M8-F839R+H845R+T848K.

Neben der Spannungssensitivität wurde in weiteren Experimenten auch die Menthol- und Icilinsensitivität dieser S4-Varianten untersucht. Im Gegensatz zu einer nahezu wildtypischen Mentholsensitivität (200  $\mu\text{M}$ ) ist eine Icilinsensitivität (30  $\mu\text{M}$ ) bei faktisch keiner dieser S4-Spannungssensormutanten detektierbar (s. Abb. 50). Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Icilinsensitivität nicht nur durch Mutationen innerhalb der S3 sondern auch durch Mutationen in der S4 selektiv aufgehoben werden kann.

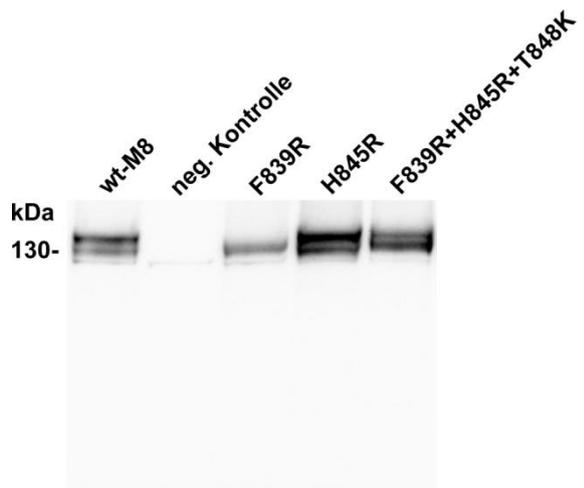


**Abb. 49:** I/V-Kurve und relative Offenwahrscheinlichkeiten ( $P_{\text{open}}$ ) wt-TRPM8 im Vergleich zu M8-H845R, M8-F839R+H845R und M8-F839R+H845R+T848K. Die I/V-Messungen sowie die Berechnungen der  $P_{\text{open}}$ -Werte erfolgten, wie in Kap. 3.2.2.7 beschrieben. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n \geq 6$  unabhängige Experimente) im Spannungsbereich zwischen -20 mV und +220 mV, wobei diese im rechten Diagramm mit einer Boltzmann-Funktion (s. Kap. 3.5) gefittet wurden.

Die einzige Ausnahme zu diesen Ergebnissen bildet dabei die nicht funktionelle Mutante M8-F839R, die auch in der Western-Blot-Analyse der Oberflächenexpression und der postrationalen Modifikation als einzige der S4-Spannungssensormutanten keine vollständige Glykosylierung aufweist (s. Abb. 51).



**Abb. 50:** Repräsentative Whole-Cell-Patch-Clamp-Messung einer M8-F839R+H845R exprimierenden HEK-293-Zelle. Die Messungen erfolgten, wie im Methodenteil (s. Kap. 3.2.2.6) beschrieben, bei einem Haltepotential von -60 mV bei Raumtemperatur. Nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration (w.c.) wurden die Stimuli (30  $\mu\text{M}$  Icilin gefolgt von 100  $\mu\text{M}$  Menthol) sequenziell appliziert. Zwischen den Stimulationen fand ein Waschschritt mit Standard-Badpuffer bei Raumtemperatur statt. Nach der Mentholstimulation wurden die Ströme durch NMDG geblockt.



**Abb. 51:** Western-Blot der Plasmamembranfraktionen von M8-F839R, M8-H845R, M8-F839R+H845R und M8-F839R+H845R+T848K exprimierenden HEK-293-Zellen im Vergleich zu wt-TRPM8. Bis auf die nicht funktionale Mutante M8-F839R in Bahn 3 zeigen alle anderen Mutanten die TRPM8 typischen Doppel-Banden im Bereich von 130 kDa.

## 5. Diskussion

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin, mögliche funktionelle Wechselwirkungen des postulierten S4-Spannungssensors mit anderen Domänen von TRPM8, insbesondere mit der Transmembrandomäne S3 experimentell zu verifizieren. Dazu wurde die funktionelle und strukturelle Bedeutung dieser beiden Transmembransegmente durch Einführung gezielter Mutationen systematisch analysiert.

Einer der Hauptbefunde der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis einer funktionellen Kooperation zwischen den Transmembrandomänen S3 und S4. Es konnte gezeigt werden, dass die Ladungen der zentral gelegenen Aminosäurereste D802 (S3) und R842 (S4) gemeinsam eine entscheidende Rolle für die korrekte Faltung bzw. für die posttranslationale Reifung (Glykosylierung) von TRPM8 spielen. Darüber hinaus haben Ladungsveränderungen im zentralen Abschnitt von S3 bzw. S4 häufig analoge funktionelle Effekte, z.B. Verlust der Icilinsensitivität bzw. Reduktion des spannungsabhängigen Ansprechverhaltens. Die durch systematische Veränderung der Ladungsverteilung innerhalb von S3 und S4 hervorgerufenen funktionellen Effekte auf das spannungsabhängige Schaltverhalten von TRPM8, stellen das bislang favorisierte Modell eines autonomen mobilen S4 Spannungssensors in Frage. Die vorliegenden Daten sprechen für ein alternatives TRPM8-Gatingmodell, in dem eine von S3 und S4 gemeinsam gebildete Proteindomäne möglicherweise durch die Wechselwirkung mit einem negativ geladenen Molekül wie etwa dem Phospholipid PIP<sub>2</sub> die Spannungsabhängigkeit von TRPM8 vermittelt.

Das herkömmliche Modell für die spannungsabhängige Aktivierung von TRPM8 basierte im Wesentlichen auf einigen strukturellen Ähnlichkeiten im Kanalaufbau zwischen TRPM8 und dem Shaker H4 Kaliumkanal, eines prominenten Vertreters aus der Familie der klassischen spannungsabhängigen Kationenkanäle (Voets et al., 2007). Das zentrale Element im spannungsgesteuerten Schaltmechanismus dieses Kanals bildet das Transmembransegment S4, welches insgesamt 6 positiv geladene, regelmäßig angeordnete Aminosäurereste enthält und somit prädestiniert ist, auf Spannungsänderungen an der Zellmembran in definierter Weise zu reagieren (Catterall & Yarov-Yarovny, 2010). Eine durch eine Depolarisation der Zellmembran induzierte gerichtete Bewegung dieser S4 Domäne bildet den Ausgangspunkt für eine Serie von Konformationsänderungen, die schließlich zur Öffnung der Kanalpore füh-

ren. Dabei ist festzuhalten, dass für den exakten Ablauf dieser Prozesse noch kein allgemein akzeptiertes Modell zur Verfügung steht.

Bei TRPM8 handelt es sich um einen Kanal, der natürlicherweise durch kalte Temperaturen bzw. als kühlend empfundene pflanzliche Inhaltsstoffe z.B. Menthol aktiviert wird (Peier et al., 2002; McKemy et al., 2002; Reid et al., 2002). Unter physiologischen Bedingungen findet bei TRPM8, ganz im Gegensatz zu den klassischen spannungsabhängigen Kationenkanälen, keine rein spannungsinduzierte Aktivierung statt. Es wurde nämlich gezeigt, dass bei der Aktivierung von TRPM8 die native Strom-Spannungs-Beziehung durch die Einwirkung natürlicher Stimuli z.B. kalte Temperaturen und Menthol derart beeinflusst wird, dass eine Öffnung der Kanalpore bei physiologischen Membranpotentialen stattfinden kann (Voets et al., 2004, 2007). Aus diesen experimentellen Beobachtungen leitete sich die plausible Hypothese ab, dass bei TRPM8 eine direkte Wechselwirkung zwischen den diversen Kanalagonisten und dem Transmembransegment S4 stattfindet, um eine volle Mobilisierung des vergleichsweise rudimentären Spannungssensors zu erreichen. Durch Struktur-Funktions-Analysen innerhalb der S4-Domäne und der Charakterisierung der Sensitivität diverser S4-Mutanten gegenüber Kälte, Menthol bzw. Spannungsänderungen wurden experimentelle Beobachtungen gemacht, die mit dieser Hypothese gut vereinbar waren (Voets et al., 2007). Allerdings wurden bei diesen Untersuchungen etwaige Auswirkungen von Mutationen auf die Faltung bzw. posttranslationale Modifikationen außer Acht gelassen.

In einem von Pedretti et al. (2009, 2011) entwickelten Computermodell, das u.a. auf den von Voets et al. (2007) gewonnenen experimentellen Daten basierte, wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem der Kanalagonist Menthol eine direkte elektrostatische Interaktion zwischen den Transmembransegmenten S3 und S4 induziert, welche eine spezifische Konformationsänderung von S4 bewirkt.

Die dabei konkret postulierte elektrostatische Interaktion zwischen D802 in S3 und R842 in S4 sollte im Rahmen dieser Arbeit verifiziert werden. Dazu wurden Ladungsumkehrmutationen zunächst separat an beiden Positionen sowie in Kombination durchgeführt und deren Auswirkungen auf die Kanalfunktion analysiert.

Eine Ladungsumkehr an der zentralen Position 842 innerhalb des hypothetischen S4-Spannungssensors von TRPM8 führt zwar zum vollständigen Funktionsverlust des Kanals, wobei die Western-blot Analysen dieser Arbeit aber beweisen, dass dieser Funktionsausfall primär durch eine fehlerhafte Faltung und nicht durch einen immobilisierten S4-

Spannungssensor verursacht wird. Dementsprechend führt eine zusätzliche Ladungsumkehr an Position 802 in S3 zur weitgehend vollständigen Restauration des Wildtyp-Phänotyps, was den Schluss nahelegt, dass die vergleichsweise geringe Anzahl an positiven Ladungen in S4 für die Spannungsabhängigkeit von TRPM8 keine entscheidende Bedeutung haben können. Dieses Ergebnis steht scheinbar im Widerspruch zu den Daten von Voets et al. (2007), die durch eine Neutralisation des zentralen S4-Arginins R842 (R842A, R842Q), drastische Effekte sowohl auf die Spannungsabhängigkeit als auch auf die Sensitivität von TRPM8 gegenüber Menthol bzw. Kälte erzeugen konnten. Jedoch wurden in der gleichen Studie weitere positiv geladene Aminosäurereste in der S4 bzw. S4/S5-Region neutralisiert, mit dem Resultat, dass diese entweder unwesentliche (R851Q) oder sogar entgegengesetzte Effekte (K856A) auf die Sensitivität gegenüber Spannung bzw. Menthol und Kälte hervorrufen. In diesem Zusammenhang wurde von anderen Autoren außerdem festgestellt, dass die von Voets et al. (2007) ermittelte, über S4 transferierte kapazitive Gesamtladung von TRPM8 durch die Neutralisation von R842 bzw. K856 nur in geringem Umfang reduziert wird (Latorre et al., 2011). Ebenso widersprüchlich ist der Befund, dass die Neutralisation des Argininrestes R851, der sich zwischen R842 und K856 befindet, bei TRPM8 keinerlei Reduktion der transferierten *gating charge* hervorruft (Voets et al., 2007).

Weitere Resultate der vorliegenden Arbeit stützen ebenfalls die Hypothese einer für die Spannungsabhängigkeit von TRPM8 untergeordneten Bedeutung positiv geladener Aminosäurereste in S4. Eine durch das Einfügen zusätzlicher Argininreste erreichte, nahezu vollständige Restauration des S4-Spannungssensors analog zu Shaker H4, führt bei TRPM8 nicht zu einer Verstärkung sondern zu einer deutlichen Verminderung der Spannungs-sensitivität, ohne das Ansprechverhalten gegenüber Kälte und Menthol signifikant zu verändern.

Aus dem Vergleich der Spannungsabhängigkeiten zwischen den TRPM8-Mutanten D802R und D802R+R842D kann geschlossen werden, dass durch die Mutation R842D eine Linksverschiebung der I/V-Kurve induziert wird. Dieser Befund kann zusammen mit den zuvor genannten Ergebnissen als Hinweis für eine besondere Bedeutung negativer Ladungen für die Spannungssensitivität von TRPM8 interpretiert werden.

Die Existenz eines klassischen S4-Spannungssensors bei TRPM8 wird auch durch Resultate anderer Arbeitsgruppen (z.B. Matta & Ahern, 2007) in Frage gestellt. Dabei konnte ebenfalls mit TRPM8 transfizierten HEK-293-Zellen gezeigt werden, dass nur ca. 2/3 der maximalen

Offenwahrscheinlichkeit von TRPM8 durch Depolarisation zu erreichen sind. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass ca. 1/3 der TRPM8-Kanäle zwar funktional, aber nicht durch Spannung zu aktivieren sind, was gegen das Wirken eines herkömmlichen Spannungssensors spricht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diesen Befund.

Ein weiteres Argument gegen das ursprüngliche Spannungssensormodell resultiert aus der Tatsache, dass TRPM8 bei sehr hohen Menthol-Konzentrationen ein spannungsunabhängiges Schaltverhalten zeigt. Dies deutet eher auf eine allosterische Interaktion zwischen TRPM8 und den hydrophoben bzw. negativ geladenen Agonisten (Menthol, Icilin, PIP<sub>2</sub>) hin (Matta & Ahern, 2007).

Auch die Einführung mehrerer positiver Ladungen in das Transmembransegment S3 (D796R+D802R) hat keine wesentlichen Auswirkungen auf die Spannungsabhängigkeit von TRPM8, womit gezeigt werden konnte, dass neben der S4 auch die S3 kein potentieller Kandidat für einen, den klassischen Vorstellungen entsprechenden, mobilen Spannungssensor ist.

Die Ladungsverteilung im zentralen Bereich sowohl der S3 als auch der S4 scheint weniger für die Spannungssensitivität von TRPM8 als vielmehr für die strukturelle Integrität des Kanals von Bedeutung zu sein. Bestimmte Mutationen, die die Ladungsverteilung in diesem Bereich verändern, führen zu massiven Funktionseinschränkungen bis hin zum völligen Funktionsverlust von TRPM8 und damit einhergehend zu einer fehlenden Glykosylierung. Da die Ladungsveränderungen innerhalb der S3 und der S4 nicht direkt die in der Pore zwischen S5 und S6 gelegene Glykosylierungsstelle (N934) von TRPM8 betreffen (Erler et al., 2006), ist die ausbleibende Glykosylierung auf eine fehlerhafte Faltung zurückzuführen.

Entsprechende Beobachtungen wurden auch schon für den strukturell verwandten Shaker K<sup>+</sup>-Kanal beschrieben, bei dem Ladungsveränderungen an neuralgischen, strukturgebenden Positionen in S3 und S4 Fehlfaltungen bzw. eine fehlerhafte Integration in die ER-Membran induzieren (Papazian et al., 1995; Zhang et al., 2007). Auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezogen, wäre eine entsprechend fehlerhafte Integration von TRPM8 in die ER-Membran eine plausible Erklärung für die beobachteten Glykosylierungsdefekte.

Die mit der aberranten Glykosylierung einhergehende, massive Funktionseinschränkung bei den entsprechenden Mutanten wird höchstwahrscheinlich durch eine fehlerhafte Proteinfaltung verursacht und nicht etwa durch das Ausbleiben der Glykosylierung. Letztere hat für

sich genommen einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Funktionalität von TRPM8 (Erler et al., 2006; Pertusa et al., 2012).

Die zentralen Bereiche der Transmembrandomänen S3 und S4 haben insgesamt gesehen eine nahezu äquivalente funktionelle Bedeutung für die Agonisten-vermittelte Aktivierung von TRPM8. Das Transmembransegment S3 enthält das innerhalb der spannungsabhängigen Kationenkanäle hoch konservierte Sequenzmotiv „N-x-x-D“ (Kumánovics et al., 2002). Diese Sequenz ist bei TRPM8 essentiell für die Icilinsensitivität (Chuang et al., 2004) und aufgrund der Befunde der vorliegenden Arbeit außerdem wichtig für die Menthol-, Kälte-, und Spannungssensitivität dieses Kanals (Winking et al., 2012). Eine sehr ähnliche funktionelle Bedeutung weist auch die Transmembrandomäne S4 auf. Neben der generellen und im Einzelnen schwer voneinander abzugrenzenden Bedeutung für die Sensitivität gegenüber Kälte, Menthol bzw. Spannung (Voets et al., 2007) konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals eine spezifische Bedeutung der S4 für die Empfindlichkeit von TRPM8 gegenüber Icilin demonstriert werden (Kühn et al., 2013).

Der engste Verwandte von TRPM8 innerhalb der TRP-Ionenkanalfamilie ist der ADPR-sensitive TRPM2-Kanal. Dieser Kanal weist im Bereich der Transmembrandomänen S3 und S4 eine sehr hohe Sequenzhomologie sowie eine identische Ladungsverteilung im Vergleich zu TRPM8 auf, ist dabei aber weder spannungsabhängig noch durch Kälte, Menthol oder Icilin zu aktivieren (Perraud et al., 2001; Hara et al., 2002; Wehage et al., 2002; Inamura et al., 2003). Auf Grund dieses komplett unterschiedlichen Schaltverhaltens vor dem Hintergrund der strukturellen Gemeinsamkeiten sind vergleichende Analysen zur näheren Charakterisierung der Struktur-Funktions-Beziehungen dieser beiden Kanäle ein probates Mittel. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das ebenfalls in TRPM2 hochkonservierte N-x-x-D-Sequenzmotiv auch für die Funktionalität von TRPM2 von entscheidender Bedeutung ist, wobei aber deutliche Unterschiede zu TRPM8 zu beobachten sind. Zusammengekommen deuten die Ergebnisse der Arbeit auf die Wichtigkeit des Sensormodules sowohl für das spannungsabhängige, durch Liganden und Kälte beeinflusste Schaltverhalten von TRPM8 als auch für das spannungsunabhängige Schaltverhalten von TRPM2 durch ADPR hin. Die Unterschiede in der Funktion des N-x-x-D-Sequenzmotives spiegeln dabei möglicherweise die Divergenz der verschiedenen Aktivierungsmechanismen wider.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abe J, Hosokawa H, Sawada Y, Matsumura K, Kobayashi S, (2005). Ca(2+)-dependent PKC activation mediates menthol-induced desensitization of transient receptor potential M8. *Neurosci Lett* **397**: 140-144.
- Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* **26**: 882-893.
- Andersson DA, Chase HW, Bevan S (2004). TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH. *J Neurosci* **24**: 5364-5369.
- Andersson DA, Nash M, Bevan S (2007). Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *J Neurosci* **27**: 3347-3355.
- Bandell M, Dubin AE, Petrus MJ, Orth A, Mathur J, Hwang SW, Patapoutian A (2006). High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nat Neurosci* **9**: 493-500.
- Bassi MT, Manzoni M, Monti E, Pizzo MT, Ballabio A, Borsani G (2000). Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucolipidin and identification of the two major founder mutations causing mucopolidosis type IV. *Am J Hum Genet* **67**: 1110-1120.
- Bargal R, Avidan N, Ben-Asher E, Olender Z, Zeigler M, Frumkin A, Raas-Rothschild A, Glusman G, Lancet D, Bach G (2000). Identification of the gene causing mucopolidosis type IV. *Nat Genet* **26**: 118-123.
- Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* **448**: 204-208.
- Bessman MJ, Frick DN, O'Handley SF (1996). The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J Biol Chem* **271**: 25059-25062
- Bessman MJ, Walsh JD, Dunn CA, Swaminathan J, Weldon JE, Shen J (2001). The gene ygdP, associated with the invasiveness of Escherichia coli K1, designates a Nudix hydrolase, Orf176, active on adenosine (5')-pentaphospho-(5')-adenosine (Ap5A). *J Biol Chem* **276**: 37834-37838

- Bidaux G, Flourakis M, Thebault S, Zholos A, Beck B, Gkika D, Roudbaraki M, Bonnal JL, Mauroy B, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N (2007). Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function. *J Clin Invest* **117**: 1647-1657.
- Birnboim HC, Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-23.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brauchi S, Orio P, Latorre R (2004). Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 15494-15499.
- Brauchi S, Orta G, Salazar M, Rosenmann E, Latorre R (2006). A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J Neurosci* **26**: 4835-4840.
- Catterall WA, Yarov-Yarovoy V (2010) Helical motion of an S4 voltage sensor revealed by gating pore currents. *Channels* **4**:75-7.
- Chodon D, Guilbert A, Dhennin-Duthille I, Gautier M, Telliez MS, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H (2010). Estrogen regulation of TRPM8 expression in breast cancer cells. *BMC Cancer* **10**: 212.
- Chuang HH, Neuhausser WM, Julius D (2004). The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron* **43**: 859-869.
- Clapham DE (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**: 517-524.
- Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ Jr, Wang Y, Lawrence D, D'Andrea MR, Brand MR, Liu Y, Flores CM, Qin N (2007). Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* **54**: 379-386.
- Cosens DJ, Manning A (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* **224**: 285-287.

- Csanády L, Töröcsik B (2009). Four  $\text{Ca}^{2+}$  ions activate TRPM2 channels by binding in deep crevices near the pore but intracellularly of the gate. *J Gen Physiol* **133**: 189-203.
- Daniels RL, Takashima Y, McKemy DD (2009). Activity of the neuronal cold sensor TRPM8 is regulated by phospholipase C via the phospholipid phosphoinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* **284**: 1570-1582.
- De Blas GA, Darszon A, Ocampo AY, Serrano CJ, Castellano LE, Hernández-González EO, Chirinos M, Larrea F, Beltrán C, Treviño CL (2009). TRPM8, a versatile channel in human sperm. *PLoS One* **4**: e6095.
- Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A (2007). TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* **54**: 371-378.
- Dragoni I, Guida E, McIntyre P (2006). The cold and menthol receptor TRPM8 contains a functional important double cysteine motif. *J Biol Chem* **281**: 37353-37360.
- Du J, Xie J, Yue L (2009). Modulation of TRPM2 by acidic pH and the underlying mechanisms for pH sensitivity. *J Gen Physiol* **134**: 471-488.
- Dunn CA, O'Handley SF, Frick DN, Bessman MJ (1999). Studies on the ADP-ribose pyrophosphatase subfamily of the nudix hydrolases and tentative identification of *trgB*, a gene associated with tellurite resistance. *J Biol Chem* **274**: 32318-32324.
- Erler I, Al-Ansary DM, Wissenbach U, Wagner TF, Flockerzi V, Niemeyer BA (2006). Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *J Biol Chem* **281**: 38396-38404.
- Fauzee NJ, Pan J, Wang YL (2010). PARP and PARG inhibitors – new therapeutic targets in cancer treatment. *Pathol Oncol Res* **16**: 469-478.
- Flockerzi V (2007). An introduction on TRP channels. *Handb Exp Pharmacol* **179**: 1-19
- Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kelsell RE, McNulty S (2006). Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res* **26**: 159-178.
- Gees M, Colsoul B, Nilius B (2010). The role of transient receptor potential cation channels in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a003962.

- Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y (2002). LTRPC2 Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* **9**: 163-173.
- Hardie RC (2011). A brief history of trp: commentary and personal perspective. *Pflugers Arch* **461**: 493-498.
- Harteneck C (2005). Funktion and pharmacology of TRPM cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **371**: 307-314.
- Heiner I, Eisfeld J, Halaszovich CR, Wehage E, Jüngling E, Zitt C, Lückhoff A (2003). Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through long TRP channel 2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem J* **371**: 1045-1053.
- Hensel H, Zotterman Y (1951). The effect of menthol on the thermoreceptors. *Acta physiol scand* **24**: 27-34.
- Inamura K, Sano Y, Mochizuki S, Yokoi H, Miyake A, Nozawa K, Kitada C, Matsushime H, Furuichi K. (2003). Response to ADP-ribose by activation of TRPM2 in the CRI-G1 insulinoma cell line. *J Membr Biol* **191**: 201-207.
- Jiang LH, Yang W, Zou J, Beech DJ (2010). TRPM2 channel properties, functions and therapeutic potentials. *Expert Opin Ther Targets* **14**: 973-988.
- Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, Schultz G, Harteneck C (2004). Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**: 129-137.
- Kühn FJ, Lückhoff A (2004). Sites of the NUDT9-H domain critical for ADP-ribose activation of the cation channel TRPM2. *J Biol Chem* **279**: 46431-46437.
- Kühn FJ, Knop G, Lückhoff A (2007). The transmembrane segment S6 determines cation versus anion selectivity of TRPM2 and TRPM8. *J Biol Chem* **282**: 27598-27609.
- Kühn FJ, Witschas K, Kühn C, Lückhoff A (2010). Contribution of the S5-pore-S6 domain to the gating characteristics of the cation channels TRPM2 and TRPM8. *J Biol Chem* **285**: 26806-26814.

- Kühn FJ, Winking M, Kühn C, Hoffmann DC, Lückhoff A (2013). Surface expression and channel function of TRPM8 are cooperatively controlled by transmembrane segments S3 and S4. *Pflugers Arch* **465**: 1599-610.
- Kumánovics A, Levin G, Blount P (2002). Family ties of gated pores: evolution of the sensor module. *FASEB J* **16**: 1623-1629.
- Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C, Vargas G (2007). ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* **42**: 427-438.
- Latorre R, Brauchi S, Madrid R, Orio P (2011). A cool channel in cold transduction. *Physiology* **26**: 273-285.
- Lepage PK, Boulay G (2007). Molecular determinants of TRP channel assembly. *Biochem Soc Trans* **35**: 81-83.
- Lerche H, Mitrovic N, Jurkat-Rott K, Lehman-Horn F (2000). Ionenkanalerkrankungen – allgemeine Charakteristika und Pathomechanismen. *Dt Ärztebl* **97**: 1826-1831
- Liu B, Qin F (2005). Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Neurosci* **25**: 1674-1681.
- Matta JA, Ahern GP (2007). Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *J Physiol* **585**: 469-482.
- McHugh D, Flemming R, Xu SZ, Perraud AL, Beech DJ (2003). Critical intracellular Ca<sup>2+</sup> dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation. *J Biol Chem* **278**: 11002-11006.
- McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**: 52-58.
- Minke B (2010). The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *J Neurogenet* **24**: 216-233.
- Montell C (2001). Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **90**: RE1.
- Montell C (2011). The history of TRP channels, a commentary and reflection. *Pflugers Arch* **461**: 499-506.

- Mukerji G, Yiangou Y, Corcoran SL, Selmer IS, Smith GD, Benham CD, Bountra C, Agarwal SK, Anand P (2006). Cool and menthol receptor TRPM8 in human urinary bladder disorders and clinical correlations. *BMC Urol* **6**: 6.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**: 263-273.
- Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N (1998). Molecular cloning of a novel putative Ca<sup>2+</sup> channel protein TRPC7 highly expressed in brain. *Genomics* **54**: 124-131.
- Nilius B, Mahieu F, Karashima Y, Voets T (2007). Regulation of TRP channels: a voltage-lipid connection. *Biochem Soc Trans* **35**: 105-108.
- Numberger M, Draguhn A (1996). Patch-Clamp Technik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Okazawa M, Inoue W, Hori A, Hosokawa H, Matsumura K, Kobayashi S (2004). Noxious heat receptors present in cold-sensory cells in rats. *Neurosci Lett* **359**: 33-36.
- Papazian DM, Shao XM, Seoh SA, Mock AF, Huang Y, Wainstock DH (1995). Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* **14**: 1293-1301.
- Pedretti A, Marconi C, Bettinelli I, Vistoli G (2009). Comparative modeling of the quaternary structure for the human TRPM8 channel and analysis of its binding features. *Biochim Biophys Acta* **1788**: 973-982.
- Pedretti A, Labozzetta A, Lo Monte M, Beccari AR, Moriconi A, Vistoli G (2011). Exploring the activation mechanism of TRPM8 channel by targeted MD simulations. *Biochem Biophys Res Commun* **414** :14-19.
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**: 705-715.
- Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM (2001). ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* **411**: 595-599.

- Perraud AL, Shen B, Dunn CA, Rippe K, Smith MK, Bessman MJ, Stoddard BL, Scharenberg AM (2003). NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase. *J Biol Chem* **278**: 1794-1801.
- Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, Kang S, Smith MK, Schmitz C, Knowles HM, Ferraris D, Li W, Zhang J, Stoddard BL, Scharenberg AM (2005). Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem* **280**: 6138-6148
- Pertusa M, Madrid R, Morenilla-Palao C, Belmonte C, Viana F (2012). N-glycosylation of TRPM8 ion channels modulates temperature sensitivity of cold thermoreceptor neurons. *J Biol Chem* **287**: 18218-18229.
- Prekumar LS, Raisinghani M, Pingle SC, Long C, Pimentel F (2005). Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation. *J Neurosci* **25**: 11322-11329.
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006). An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**: 619-647.
- Reid G, Flonta ML (2002). Ion channels activated by cold and menthol in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci Lett* **324**: 164-168.
- Reiser J1, Polu KR, Möller 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 (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* **37**: 739-44.
- Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE (2005). PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* **8**: 626-634.
- Rohacs T, Yudin Y (2012). Regulation of TRPM8 channel activity. *Mol Cell Endocrinol* **353**: 68-74.
- Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ (2005). Cystic fibrosis. *N Engl J Med* **352**: 1992-2001.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-91

- Sano Y, Inamura K, Miyake A, Mochizuki S, Yokoi H, Matsushime H, Furuichi K (2001). Immunocyte  $\text{Ca}^{2+}$  influx system mediated by LTRPC2. *Science* **293**: 1327-1330.
- Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M (2002). Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet* **31**: 166-70.
- Shen BW, Perraud AL, Scharenberg A, Stoddard BL (2003). The crystal structure and mutational analysis of human NUDT9. *J Mol Biol* **332**: 385-398.
- Starkus J, Beck A, Fleig A, Penner R (2007). Regulation of TRPM2 by extra- and intracellular calcium. *J Gen Physiol* **130**: 427-440.
- Starkus JG, Fleig A, Penner R (2010). The calcium-permeable non-selective cation channel TRPM2 is modulated by cellular acidification. *J Physiol* **588**: 1227-1240.
- Stein RJ, Santos S, Nagatomi J, Hayashi Y, Minnery BS, Xavier M, Patel AS, Nelson JB, Futrell WJ, Yoshimura N, Chancellor MB, De Miguel F (2004). Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J Urol* **172**: 1175-1178.
- Sumoza-Toledo A, Penner R (2011). TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signaling. *J Physiol* **589**: 1515-1525.
- 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 (2000). Mucopolidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum Mol Genet* **9**: 2471-2478.
- Sutters M, Germino GG (2003). Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular genetics and pathophysiology. *J Lab Clin Med* **141**: 91-101.
- Tang Z, Kim A, Masuch T, Park K, Weng H, Wetzel C, Dong X (2013). Pirt functions as an endogenous regulator of TRPM8. *Nat Commun* **4**: 2179.
- Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M (2006). TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* **25**: 1804-1815.

- Togashi K, Inada H, Tominaga M (2008). Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Br J Pharmacol* **153**: 1324-1330.
- Tong Q, Zhang W, Conrad K, Mostoller K, Cheung JY, Peterson BZ, Miller BA (2006). Regulation of the transient receptor potential channel TRPM2 by the Ca<sup>2+</sup> sensor calmodulin. *J Biol Chem* **281**: 9076-9085.
- Tóth B, Csanády L (2012). Pore collapse underlies irreversible inactivation of TRPM2 cation channel currents. *PNAS* **109**: 13440-13445.
- Tsavalier L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* **61**: 3760-3769.
- Tsuruda, PR, Julius D, Minor DL Jr (2006). Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron* **51**: 201-212.
- Uchida K, Dezaki K, Damdindorj B, Inada H, Shiuchi T, Mori Y, Yada T, Minokoshi Y, Tominaga M (2010). Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. *Diabetes* **60**: 119-126.
- Uemura T, Kudoh J, Noda S, Kanba S, Shimizu N (2005). Characterization of human and mouse TRPM2 genes: identification of a novel N-terminal truncated protein specifically expressed in human striatum. *Biochem Biophys Res Commun* **328**: 1232-1243.
- Vanden Abeele F, Zholos A, Bidaux G, Shuba Y, Thebault S, Beck B, Flourakis M, Panchin Y, Skryma R, Prevarskaya N (2006). Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2-dependent gating of TRPM8 by lysophospholipids. *J Biol Chem* **281**: 40174-40182.
- Venkatachalam K, Montell C (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* **76**: 387-417.
- Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* **430**: 748-754.
- Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B (2005). Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol* **1**: 85-92.

- Voets T, Owsianik G, Janssens A, Talavera K, Nilius B (2007). TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nat Chem Biol* **3**: 174-182.
- Vriens J, Owsianik G, Fisslthaler B, Suzuki M, Janssens A, Voets T, Morisseau C, Hammock BD, Fleming I, Busse R, Nilius B (2005). Modulation of the Ca<sup>2+</sup> permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. *Circ Res* **97**: 908-15.
- Walder RY, Landau D, Meyer P, Shalev H, Tsolia M, Borochowitz Z, Boettger MB, Beck GE, Englehardt RK, Carmi R, Sheffield VC (2002). Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet* **31**: 171-174.
- Wehage E, Einfeld J, Heiner I, Jüngling E, Zitt C, Lückhoff A (2002). Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem* **277**: 23150-23156.
- Wei ET, Seid DA (1983). AG-3-5: a chemical producing sensations of cold. *J Pharm Pharmacol* **35**: 110-112.
- Winking M, Hoffmann DC, Kühn C, Hilgers RD, Lückhoff A, Kühn FJ (2012). Importance of a conserved sequence motif in transmembrane segment S3 for the gating of human TRPM8 and TRPM2. *PLoS One* **7**: e49877.
- 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 (2005). A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* **308**: 1801-1804.
- Yang W, Zou J, Xia R, Vaal ML, Seymour VA, Luo J, Beech DJ, Jiang LH (2010). State-dependent inhibition of TRPM2 channel by acidic pH. *J Biol Chem* **285**: 30411-30418.
- Yee NS, Zhou W, Lee M (2010). Transient receptor potential channel TRPM8 is over-expressed and required for cellular proliferation in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Lett* **297**: 49-55.
- Yellen G (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* **419**: 35-42.

- Zakharian E, Cao C, Rohacs T (2010). Gating of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels activated by cold and chemical agonists in planar lipid bilayers. *J Neurosci* **30**: 12526-12534.
- Zhang L, Sato Y, Hessa T, von Heijne G, Lee JK, Kodama I, Sakaguchi M, Uozumi N (2007). Contribution of hydrophobic and electrostatic interactions to the membrane integration of the Shaker K<sup>+</sup> channel voltage sensor domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 8263-8268.
- Zhang W, Chu X, Tong Q, Cheung JY, Conrad K, Masker K, Miller BA (2003). A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death. *J Biol Chem* **278**: 16222-16229.
- Zhang W, Hirschler-Laszkiewicz I, Tong Q, Conrad K, Sun S, Penn L, Barber DL, Stahl R, Carey DJ, Cheung JY, Miller BA (2006). TRPM2 is an ion channel that modulates hematopoietic cell death through activation of caspases and PARP cleavage. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**: 1146-1159.

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung/ Einheit	Bezeichnung	Englische Bezeichnung (wenn Abkürzung auf dieser beruht)
$\Omega$	Ohm	
$\mu$	Mikro	
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	
A	Ampere	
AA	Arachidonsäure	<i>Arachidonic acid</i>
ADPR	Adenosin-Diphosphat-Ribose	
Bp1	Standardbadpuffer 1	
Bp2N	Standardbadpuffer 1 mit NMDG	
BSA	Rinderalbumin	<i>bovine serum albumin</i>
C	Cystein	
cDNA	komplementäre DNS	<i>complementary DNA</i>
<i>CMR1</i>		<i>cold and menthol receptor 1</i>
D	Asparaginsäure	
Da	Dalton	
DAG	Diacylglycerol	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate	
DRG	Spinalganglion	<i>dorsal root ganglion</i>
ds	Doppelstrang	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
F	Phenylalanin	
FCS	Fetales Kälberserum	<i>fetal calf serum</i>
g	Gramm	

<i>g</i>	Erdbeschleunigungskonstante	<i>gravity</i>
G	Glycin	
G	giga	
GFP	grün fluoreszierendes Protein	
h	Stunde	<i>hour</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	
HEK-Zelle	menschliche embryonale Nierenzelle	<i>human embryonic kidney cell</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase	<i>horseradish peroxidase</i>
I	Isoleucin	
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5 Triphosphat	
k	kilo	
K	Lysin	
kb	Kilobasenpaare	
K <sub>v</sub>	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal	
l	Liter	
L	Leucin	
LB	Luria-Bertani Medium	
LDS	Lithiumdodecylsulfat	
LPL	Lysophospholipid	
<i>LTRPC2</i>		<i>long term potential receptor channel 2</i>
m	mili	
M	mega	
M	Molar (mol/Liter)	
min	Minute	
ml	Mililiter	
n	nano	
N	Asparagin	
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid	
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin	
nt	Nukleotide	
NUDT9		<i>human nucleoside disphosphate-linked</i>

		<i>moiety X-type motif 9</i>
p	piko	
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
PARG	Poly(ADPR)-Glykohydrolase	
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase	
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI	Protease-Inhibitor	
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat	
<i>Pirt</i>		<i>phosphoinositide interacting regulator of TRP</i>
PKC	Phosphokinase C	
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A2	
PLC	Phospholipase C	
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid	
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure	<i>poly unsaturated fatty acid</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid	
Q	Glutamin	
R	Arginin	
REN	Restriktionsendonuklease	
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur	
s	Sekunde	
S	Siemens	
SEM	Standardfehler des Mittelwerts	<i>standard error of the mean</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SR	Spannungsrampe	
SSP	Spannungstufenprotokoll	
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	
TG	Trigeminal Nerv	<i>trigeminal ganglion</i>
TE	Tris-EDTA	
TM	Transmembrandomäne	

---

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>TRPM2</i>	<i>transient potential receptor melastatin-2</i>
<i>TRPM8</i>	<i>transient potential receptor melastatin-8</i>
ü.N.	über Nacht
V	Volt
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7.2 Publikationen

- **Winking M**, Hoffmann DC, Kühn C, Hilgers RD, Lückhoff A, Kühn FJ (2012). Importance of a conserved sequence motif in transmembrane segment S3 for the gating of human TRPM8 and TRPM2. *PLoS One* 7: e49877.
- Kühn FJ, **Winking M**, Kühn C, Hoffmann DC, Lückhoff A (2013). Surface expression and channel function of TRPM8 are cooperatively controlled by transmembrane segments S3 and S4. *Pflugers Arch* 465: 1599-610.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir bei der Anfertigung meiner Dissertation ihre Unterstützung zukommen ließen.

Ein ganz besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Frank Kühn, nicht nur für die Überlassung des Themas, für die zahlreichen Anregungen und vielfältigen Unterstützungen während der Arbeit, sondern auch für die Gelegenheit, eigene Vorstellungen umzusetzen.

Auch Herrn Prof. Dr. Marc Spehr möchte ich ein herzliches Dankeschön für die Übernahme des Zweitgutachtens aussprechen.

Für die Möglichkeit diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können, bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Lückhoff.

Darüber hinaus gebührt ein besonderer Dank Dr. Daniel Hoffman, zum einen für die umfangreiche Hilfe bei der Durchführung eines großen Teils der proteinbiochemischen Arbeiten und zum anderen für die konstruktiven Diskussionen und Ratschläge während meiner Arbeit.

Ebenso danke ich Frau Dr. Cornelia Kühn, Eberhard Jüngling sowie Marina Wolf für die gute Zusammenarbeit und die hervorragende, hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meinen Eltern, meiner Großmutter sowie in besonderem Maße meiner Frau für die stete Unterstützung in den vergangenen Jahren.