

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

Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Erhöhte Differenzierung von humanen  
regulatorischen T-Zellen durch Blockade  
des Melastatin-ähnlichen Transienten  
Rezeptor Potential Kationen Kanal 7  
(TRPM7)

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Dorothea Lewitz

aus  
Eutin, Schleswig-Holstein

München, 2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

|  |   |
|--|---|
| Berichterstatter:                                    | Prof. Dr. med. Thomas Gudermann               |
| Mitberichterstatter:                                 | PD Dr. Klaus Dornmair<br>PD Dr. Gerald Messer |
| Mitbetreuung durch die<br>promovierte Mitarbeiterin: | Prof. Dr. rer. nat. Susanna Zierler           |
| Dekan:   | Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel          |

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2021

## Abstract

Not only is magnesium ( $Mg^{2+}$ ) involved in the human body as an essential element in several hundred enzymatic reactions, it also affects the body's immune response. Studies show a lack of  $Mg^{2+}$  leads to increased inflammatory reaction. An indication of the role of  $Mg^{2+}$  in immune cell activation is a human X-linked immunodeficiency associated with the putative  $Mg^{2+}$  transporter 1 (MagT1). This indicates an essential role of  $Mg^{2+}$  in the activation of immune cells. Recently, the role of MagT1 as a transporter and its expression in the plasma membrane were questioned by Gilmore et al.

Therefore, the importance of the  $Mg^{2+}$ -conducting *transient receptor potential* channel (TRPM7) as a key player in these processes, needs further investigation.

TRPM7 is not only highly expressed in immune cells but also controls cellular  $Mg^{2+}$ -homeostasis. Its channel activity is negatively regulated by  $Mg^{2+}$  and  $Mg\cdot ATP$ .

The aim of this work was to analyze the expression of TRPM7 in different T cell subtypes as well as its role in the differentiation of  $CD4^+$  T lymphocytes.

Naïve  $CD4^+$  T lymphocytes were isolated and selectively stimulated to generate different T cell subtypes, which were analyzed for expression levels, function and regulation of TRPM7 using molecular and biochemical analyzes, whole cell electrophysiology and imaging techniques.

In the electrophysiological characterization TRPM7 could be detected in all examined T lymphocyte subtypes. The functional TRPM7 expression was significantly lower in  $nT_{regs}$  than in naïve  $CD4^+$  T-lymphocytes.

In the examined T lymphocyte subtypes different extracellular  $Mg^{2+}$  concentrations led to different activation of the TRPM7 channel. The investigated  $nT_{regs}$  showed a stronger activation of TRPM7 in the absence of  $Mg^{2+}$  than naïve  $CD4^+$  T-lymphocytes.

In order to further investigate the influence of TRPM7 on the differentiation of  $CD4^+$  T lymphocyte subsets, naïve T cells were differentiated *in vitro* with or without TRPM7 blockers and varying  $Mg^{2+}$  concentrations. While increased  $Mg^{2+}$  levels had a negative impact on the rate of differentiation of  $iT_{regs}$ , both the removal of  $Mg^{2+}$  from the medium and the inhibition of TRPM7 by the known channel blockers, waixenicin A and NS8593, led to an increased differentiation rate of  $iT_{regs}$ . This might explain why systemic  $Mg^{2+}$  deficiency is often accompanied by a diminished immune system. The

---

experiments presented herein suggest an influence of TRPM7 in immunological processes.

# Zusammenfassung

Magnesium ist für den menschlichen Körper nicht nur als essentielles Element an mehreren hundert enzymatischen Reaktionen beteiligt, sondern beeinflusst auch die Immunantwort des Körpers. So führt ein Mangel an  $Mg^{2+}$  zu verstärkten Entzündungsprozessen. Ein weiterer Hinweis für die Rolle von  $Mg^{2+}$  in der Immunzellaktivierung ist ein humaner X-chromosomaler Immundefekt, welcher mit dem vermuteten  $Mg^{2+}$ -Transporter 1 (MagT1) in Verbindung gebracht wird. Das weist auf eine wesentliche Rolle von  $Mg^{2+}$  bei der Aktivierung von Immunzellen hin. Kürzlich wurde diese Ansicht jedoch durch einen Bericht von Gilmore et al. in Frage gestellt. Die Rolle von MagT1 als Transporter und seine Expression in der Plasmamembran wurden angezweifelt. Daher muss die Bedeutung des  $Mg^{2+}$  leitenden *Transient Receptor Potential* Kanals (TRPM7) als Schlüsselakteur in diesen Prozessen weiter untersucht werden.

TRPM7 wird nicht nur in Immunzellen stark exprimiert, sondern kontrolliert auch die zelluläre  $Mg^{2+}$ -Homostase. Seine Kanalaktivität wird durch  $Mg^{2+}$  und  $Mg\cdot ATP$  negativ reguliert.

Ziel dieser Arbeit war es, die Analyse der Expression von TRPM7 in verschiedenen T-Zellsubtypen sowie dessen Rolle bei der Differenzierung von  $CD4^+$  T-Lymphozyten zu untersuchen.

Es wurden naive  $CD4^+$  T-Zellen isoliert und gezielt stimuliert, um unterschiedliche T-Zell-Subtypen zu erzeugen, welche unter Verwendung molekularer und biochemischer Analysen, Ganzzell-Elektrophysiologie sowie bildgebender Verfahren auf Expressionsniveaus, Funktion und Regulation von TRPM7 untersucht wurden.

In der elektrophysiologischen Charakterisierung lies sich TRPM7 in allen untersuchten T-Lymphozyten-Subtypen nachweisen. Wobei  $nT_{regs}$  eine signifikant geringere funktionelle TRPM7-Expression als die naiven  $CD4^+$  T-Lymphozyten aufwiesen.

Verschiedene extrazelluläre  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen führten in den untersuchten T-Lymphozyten-Subtypen zu unterschiedlicher Aktivierung des TRPM7-Kanals.

Die untersuchten  $nT_{regs}$  zeigten eine stärkere Aktivierung von TRPM7 bei fehlendem  $Mg^{2+}$  als naive  $CD4^+$  T-Lymphozyten.

Um den Einfluss von TRPM7 auf T-Lymphozyten näher zu untersuchen, erfolgten *in vitro* Differenzierungsexperimente mit naïven T-Zellen mit oder ohne TRPM7-Blocker und mit variierenden  $Mg^{2+}$ -Spiegeln. Während ein erhöhter  $Mg^{2+}$ -Spiegel einen negativen Einfluss auf die Differenzierungsrate von  $iT_{regs}$  hatte, führten sowohl die Wegnahme von  $Mg^{2+}$  aus dem Medium als auch die TRPM7-Inhibition durch die bekannten Kanalblocker, Waixenicin A und NS8593, zu einer erhöhten Differenzierungsrate von  $iT_{regs}$ .

Dieses könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb ein  $Mg^{2+}$ -Defizit *in vivo* zu einer Schwächung des Immunsystems führt. Die in vorliegender Arbeit dargelegten Befunde legen einen Einfluss von TRPM7 auf immunologische Prozesse nahe.

# Inhaltverzeichnis

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Einleitung.....  | 1  |
| 1.1   | TRPM7.....   | 1  |
| 1.1.1 | Klassifikation.....  | 1  |
| 1.1.2 | Entdeckung und Expression von TRPM7.....   | 2  |
| 1.1.3 | Struktur von TRPM7.....  | 3  |
| 1.1.4 | Eigenschaften von TRPM7.....   | 4  |
| 1.1.5 | Rolle von TRPM7 im Zellzyklus.....   | 6  |
| 1.1.6 | Regulation der TRPM7-Kanal-Aktivität.....  | 6  |
| 1.1.7 | Zusammenspiel von Kanal und Kinase.....  | 8  |
| 1.1.8 | Mg <sup>2+</sup> -Homöostase in Wirbeltieren.....  | 9  |
| 1.1.9 | TRPM7 in T-Lymphozyten.....  | 10 |
| 1.2   | Das Immunsystem.....   | 11 |
| 1.2.1 | Das angeborene Immunsystem.....  | 12 |
| 1.2.2 | Das adaptive Immunsystem.....  | 12 |
| 1.2.3 | Regulatorische T-Lymphozyten.....  | 16 |
| 1.3   | Die Rolle von Mg <sup>2+</sup> im Immunsystem.....   | 16 |
| 1.5   | Projektziele.....  | 20 |
| 2     | Material und Methoden.....   | 21 |
| 2.1   | Materialien.....   | 21 |
| 2.1.1 | Spenderblut gesunder Probanden.....  | 21 |
| 2.1.2 | Isolation von T-Lymphozyten.....   | 21 |
| 2.1.3 | Materialien zur Durchführung der Durchflusszytometrie.....   | 22 |
| 2.1.4 | Immunfärbung von TRPM7.....  | 26 |
| 2.1.5 | Geräte.....  | 27 |
| 2.2   | Methoden.....  | 28 |
| 2.2.1 | T-Lymphozyten Isolation.....   | 28 |
| 2.1.2 | Durchflusszytometrie.....  | 30 |
| 2.2.2 | Durchflusszytometrische Analyse.....   | 32 |
| 2.2.3 | T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 17-Differenzierung und Isolation.....                               | 34 |
| 2.2.4 | Elektrophysiologische Techniken.....   | 35 |
| 2.2.5 | Immunzytochemische Färbung von TRPM7.....  | 38 |
| 2.2.6 | Differenzierung von speziellen T-Lymphozyten-Subtypen.....   | 39 |
| 3     | Ergebnisse.....  | 42 |
| 3.1   | TRPM7-Expression in verschiedenen T-Lymphozyten Subtypen.....  | 42 |
| 3.2   | Elektrophysiologische Charakterisierung der TRPM7-Kanalaktivität in<br>verschiedenen T-Zellsubtypen..... | 43 |
| 3.2.1 | TRPM7-Kanalaktivität.....  | 43 |

---

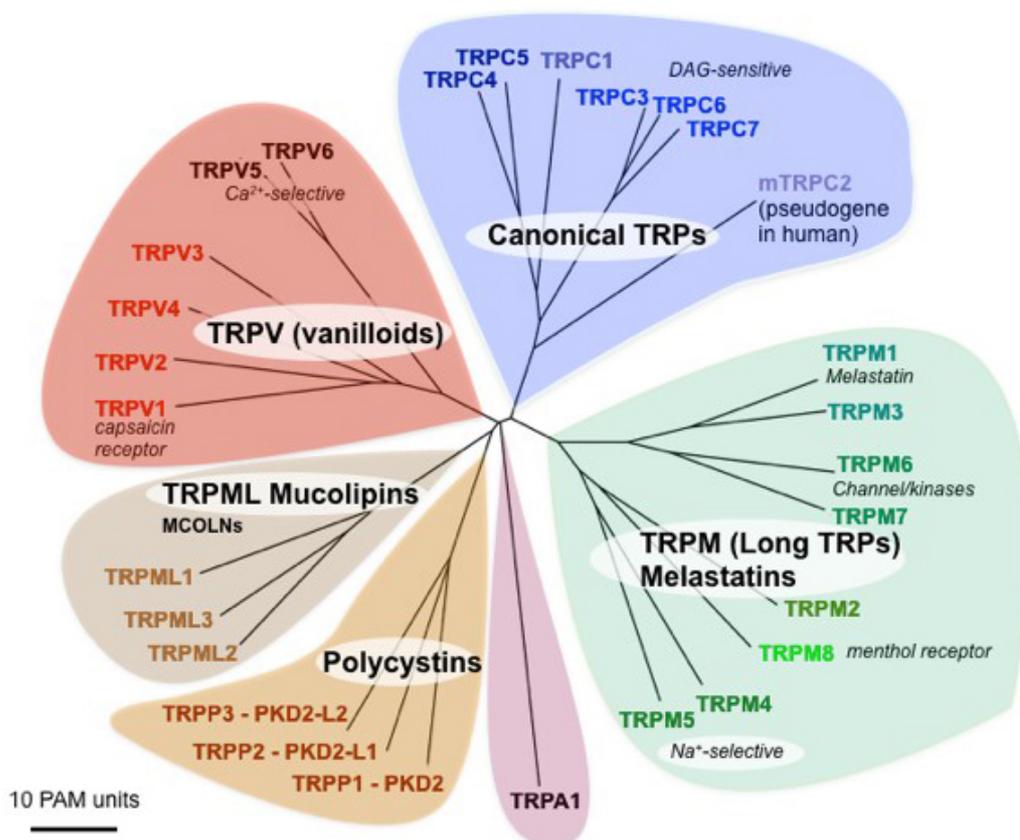
|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.2.2 | Effekt von extrazellulärem $Mg^{2+}$ .....   | 46 |
| 3.3   | Einfluss von TRPM7 und $Mg^{2+}$ auf die Differenzierung von induzierten $T_{reg}$ -<br>Lymphozyten ( $iT_{regs}$ )..... | 47 |
| 3.3.1 | <i>In vitro</i> Differenzierung von $iT_{regs}$ .....  | 48 |
| 3.3.2 | Negativer Effekt von Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) auf die <i>in vitro</i><br>Differenzierung von $iT_{regs}$ .....            | 48 |
| 3.3.3 | TRPM7-Blockade verstärkt die $iT_{reg}$ -Differenzierung .....   | 50 |
| 3.3.4 | Rettung des negativen Effekts von $Mg^{2+}$ auf die Differenzierung<br>von $iT_{regs}$ .....                             | 52 |
| 3.4.1 | Elektrophysiologischer Vergleich <i>in vitro</i> differenzierter $T_H1$ -<br>und $T_H17$ -Effektorzellen.....            | 53 |
| 3.4.2 | Vergleich aller T-Helfer-Populationen bei $Mg^{2+}$ -freier externer<br>Lösung .....                                     | 57 |
| 4     | Diskussion .....   | 61 |
| 4.1.1 | Vergleich von $nT_{regs}$ und naïven $CD4^+$ T-Zellen.....   | 62 |
| 4.1.2 | Mögliche Magnesiumregulation durch TRPM7 .....   | 63 |
| 4.1.3 | Eine TRPM7-Blockade führt zu einer gesteigerten $iT_{reg}$ -<br>Differenzierung.....                                     | 64 |
| 4.1.4 | $Mg^{2+}$ wirkt sich negativ auf die $iT_{reg}$ -Differenzierung aus .....   | 64 |
| 4.1.5 | Die TRPM7-Kinase hat keinen Einfluss auf murine $iT_{regs}$ .....  | 65 |
| 4.1.6 | Ausblick .....   | 66 |
| 5     | Abkürzungsverzeichnis .....  | 68 |
| 6     | Literaturverzeichnis .....   | 74 |
|       | Lebenslauf .....   | 80 |
|       | Eidesstattliche Versicherung .....   | 0  |

# 1 Einleitung

## 1.1 TRPM7 – engl. transient receptor potential cation channel, Unterfamilie M, Mitglied 7

### 1.1.1 Klassifikation

TRPM7 gehört zu einer großen Superfamilie von transienten Rezeptorkationen-Kanälen. Die Mitglieder der TRP-Superfamilie verbinden gemeinsame Merkmale: Sechs Transmembranregionen, ein unterschiedliches Ausmaß an Sequenzhomologien und die Permeabilität für Kationen [1, 2].



**Abbildung 1 Phylogenetischer Baum der Säugetier TRP-Familie.** Der evolutionäre Abstand zeigt sich in der Länge der Äste angegeben als akzeptierte Punktmutationen, das ist die mittlere Anzahl von Substitutionen pro 100 Reste. Abbildung aus [3].

Zu den Vertretern der TRP-Superfamilie gehören die TRPC ("C" für klassisch), TRPV ("V" für vanilloid), TRPM ("M" für Melastatin), TRPN ("N" für NOMPC, kein Mechanorezeptor Potential C), TRPA, ("A" für Ankyrin, ein Adapterprotein), TRPP ("P"

für Polyzystisch, Mutation kann zu polyzystischen Nierenerkrankung führen) TRPML ("ML" für Mucolipin) (Abb. 1).

TRP-Proteine spielen eine entscheidende Rolle in der Sinnesphysiologie und steuern Prozesse wie Riechen, Schmecken, Tasten, Hören, Thermo- und Osmozeption. Darüber hinaus ermöglichen TRP-Kanäle einzelnen Zellen, Veränderungen in ihrer lokalen Umgebung wahrzunehmen. Viele TRP-Kanäle werden durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Stimuli aktiviert und wirken als Signalintegratoren [1].

Die Subgruppe TRPM wird von acht unterschiedlichen Kanälen gebildet. Die Funktionen variieren von der Regulierung der Kalziumoszillation nach T-Zell-Aktivierung (TRPM4) [4] bis zur Empfindung von Kältereizen (TRPM8) [5]. Innerhalb der TRPM-Gruppe nehmen TRPM2, 6 und 7 eine besondere Rolle ein. In Vertebraten sind sie bis jetzt die einzigen entdeckten bifunktionellen Moleküle bestehend aus einem Ionenkanal fusioniert mit einem Enzym [6] [7-12].

TRP-Kanäle spielen auch in der menschlichen Pathophysiologie eine wichtige Rolle. Es konnten bereits 17 Krankheiten identifiziert werden, deren Ursache in der Mutation eines TRP-Kanals liegt. Es gibt Hinweise für weitere durch TRP-Störungen verursachte Erkrankungen und es wurden bisher 112 Mutationen in diversen TRP-Kanälen veröffentlicht.

Beispiele für Mutationen in TRP-Kanälen, die zu folgenden Erkrankungen führen:

| <b>Kanal</b> | <b>Humane Pathologie/ Erkrankung</b>                                      | <b>Referenz</b> |
|--------------|---|-----------------|
| TRPM6        | Hypomagnesiämie und Hypokalzämie  | [13]            |
| TRPC6        | Podozytenfunktionsstörungen, familiäre fokal segmentale Glomerulosklerose | [14, 15]        |
| TRPPs        | autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung                        | [16-18]         |
| TRPML1       | Mucolipidosis Typ IV  | [16, 17, 19]    |

### 1.1.2 Entdeckung und Expression von TRPM7

Bereits 1998 gelang es Hunter et al., mit dem Maus Melastatin Gen (TRPM1) den ersten Vertreter der TRPM-Familie zu klonen. Es folgten daraufhin weitere Entdeckungen

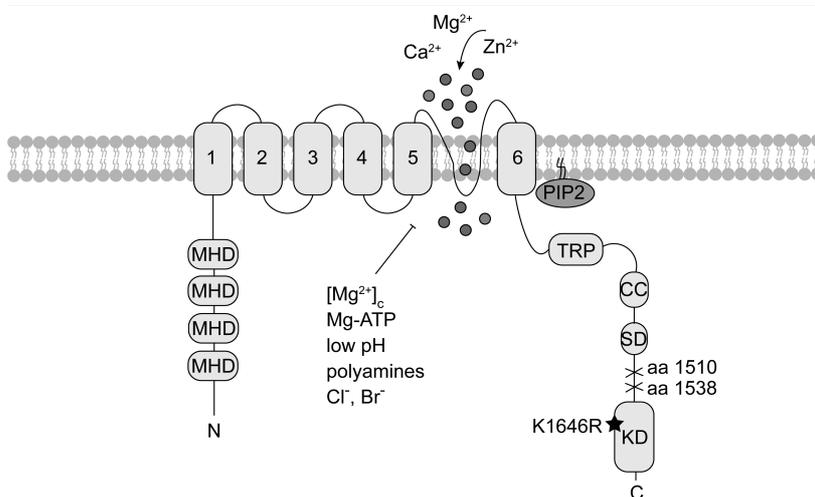
von TRPM-Molekülen, welche eine Rolle in regulatorischen Prozessen und innerhalb der Sensorik spielen.

TRPM7 wurde 2001 erstmals durch Runnels et al. identifiziert. In einem Hefe-Zwei-Hybrid-System zeigte sich TRPM7 als ein Interaktionspartner von PLC (Phospholipase C) [8]. Auch weitere Arbeitsgruppen identifizierten unabhängig davon TRPM7 als bifunktionales Protein. Ryazanova et al. [20] entdeckten TRPM7, indem sie Datenbanken nach Homologen der menschlichen eukaryoten Elongationsfaktor 2 Kinase durchsuchten. Sowohl Nadler et al. als auch Schmitz et al. gelang es, bei der Suche nach neuen Ionenkanälen humanes und murines TRPM7 zu klonieren [21-23].

Das Protein wurde bereits unter anderen Namen beschrieben, darunter TRP-PLINK, CHAK1 und LTRPC7 [8, 20, 23]. Seit 2002 wird es vereinheitlicht als TRPM7 bezeichnet [24, 25].

Der Kanal konnte mit Hilfe von quantitativer Echtzeit-PCR in allen getesteten Geweben nachgewiesen werden, weshalb man von einer ubiquitären Expression ausgeht [26].

### 1.1.3 Struktur von TRPM7



**Abbildung 2 Modulare Struktur von TRPM7.** TRPM7 (transient receptor potential cation channel M7) ist ein  $Mg^{2+}$ -permeabler Kanal, der als Chanzyne bezeichnet wird, weil er Ionenkanal- und Enzymfunktion in einem Molekül vereint. TRPM7 leitet neben  $Mg^{2+}$  auch andere zweiwertige Kationen und unterliegt einem negativen Rückkopplungsmechanismus mit  $Mg^{2+}$ . Physiologisch wurde er mit der Aufrechterhaltung der  $Mg^{2+}$ -Homöostase, sowie der Entwicklung, der Zellteilung und dem Überleben von Lymphozyten in Verbindung gebracht. Abbildung aus [27].

TRPM7, welches aus 1863 Aminosäureresten besteht, vereint einen Kanal und eine Kinase und wird daher auch als „Chanzyme“ (engl. Channel und Enzyme) bezeichnet. Es bildet sechs Transmembrandomänen, wobei sich die Kanalpore zwischen der fünften. und sechsten Transmembrandomäne befindet.

Die Struktur von TRPM7 beginnt mit einer einzigartigen aminoterminalen Sequenz aus 600-700 Aminosäuren, welche vier Teilregionen bilden. Sie wird gefolgt von einem rund 300 Aminosäuren langen Bereich, der die mutmaßlich porenbildenden Transmembran-Segmente (engl. transmembrane spanning elements) enthält. Es folgt ein Bereich mit Coiled-Coil-Charakter und schließlich eine C-terminale Verlängerung von variabler Länge und einzigartiger Struktur [8].

Der N-terminale Lobus ist strukturell ähnlich zu den anderen TRPM-Familienmitgliedern und enthält die vier Melastatin-Homology-Domain (MHD), die namensgebend für die TRPM-Familie sind.

Der C-Terminus mit der TRP-Domäne bestimmt die Nomenklatur der TRPMs [23]. Im Kontrast zu den TRPA-Kanälen enthält der C-Terminus eine Zinkfinger-homologe Domäne [29].

Der C-Terminus von TRPM7 enthält eine alpha-typische Serin/Threonin Kinase. Die Kinase phosphoryliert sich selbst an mehreren Stellen, besonders oft in einer Serinreichen Region direkt vor der Kinase-Domäne. In der intakten Zelle gibt es zwei besonders stark autophosphorylierte Stellen, welche unabhängig vom Kanal sind. Eine liegt kurz hinter der ersten Helix der Kinase-Domäne. Diese hat das Potential, die dimere Struktur oder die Stabilität der paarigen Kinase zu beeinflussen [29].

Ferner hat TRPM7 ähnliche Sequenzen wie spannungsgesteuerte Ionenkanäle, welche ebenfalls Tetramere bilden [29].

#### 1.1.4 Eigenschaften von TRPM7

TRPM7 ist ein für zweiwertige Ionen selektiver Kanal, der für  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  permeabel ist, aber auch essentielle Metalle wie  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  genauso wie nicht physiologische oder toxische Metalle wie  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , und  $\text{Sr}^{2+}$  leitet [23, 30]. Es wird angenommen, dass der Kanal konstitutiv offen ist, aber unter physiologischen Bedin-

gungen über einen negativen Regulationsmechanismus durch  $Mg^{2+}$  und  $Mg \cdot ATP$  funktionell stark inhibiert ist.

Die erste elektrophysiologische Beschreibung von TRPM7 erfolgte bereits 1999 durch Kerschbaum et al., wobei die Arbeitsgruppe den monovalenten Strom, der sich unter bivalentfreier externer Lösung allmählich entwickelte, für einen Funktionszustand von CRAC-Kanälen hielt [31].

Nadler et al. berichteten 2001 über endogene TRPM7-artige Ströme in Nierenzellen (menschliche HEK293), basophilen Granulozyten (Ratte RBL-2H3) und T-Lymphozyten (humane Jurkat T-Zellen) [23].

Im Weiteren konnten in einer Vielzahl von Zellen native TRPM7-Ströme entdeckt werden, insbesondere in Gehirn [32], Darm [33] und Herz [34].

Aktiviert TRPM7 vermittelte Ströme zeigen eine charakteristische, nicht lineare Strom-Spannungsbeziehung. Aufgrund des zweiwertigen Einstroms bei physiologisch negativen Spannungen und dem monovalenten Auswärtsstrom bei positiven Spannungen, entsteht eine ausgeprägte Auswärtsgleichrichtung. Durch extrazelluläre zweiwertige Ionen kommt es zu einem für TRPM7 typischen spannungsabhängigen Durchlässigkeitsblock. Dadurch liegt physiologisch lediglich ein geringer Einwärtsstrom vor [23, 35].

Unter Berücksichtigung der Einzelkanalleitfähigkeit von 40 pS [23, 36], zeigen HEK293-Zellen ca. 40 aktive Kanäle an ihrer Zelloberfläche.

Die Funktion der Kinase-Domäne ist noch weitaus weniger gut verstanden. Sie involviert vermutlich sowohl die Autophosphorylierung von TRPM7 als auch Phosphorylierung anderer Zellproteine wie Annexin A1 und der schweren Kette von Myosin IIA [37, 38].

Zwar wäre es denkbar, dass die Funktion der Kinase-Phosphotransferase rudimentär ist und keine besondere Aufgabe erfüllt. Dieses scheint jedoch aufgrund der Erhaltung der enzymatischen Aktivität der Kinase eher unwahrscheinlich. Die Aktivität blieb, trotz der signifikanten Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz zu anderen Mitgliedern der Alpha-Kinase-Familie erhalten [10].

Die Kinasedomäne von TRPM7 ist bekannt für die Interaktion mit einer Vielzahl von Phospholipase-C-Isoformen. Die Phospholipase C spaltet Phosphatidylinositol-4,5-

bisphosphate (Abk. PIP<sub>2</sub>) zu Inositoltrisphosphat (Abk. IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (Abk. DAG). IP<sub>3</sub> führt zu einer Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Retikulum [29].

### 1.1.5 Rolle von TRPM7 im Zellzyklus

TRPM7 lässt sich in jedem bislang getesteten Gewebe nachweisen [23, 26, 39].

Sahni et al. entwickelten TRPM7-defiziente Lymphozyten, welche einen speziellen Phänotyp ausbildeten. In normalem Medium waren diese nicht zur Proliferation fähig und gingen innerhalb von 24 Stunden in den Wachstumsstillstand über, was die besondere Rolle von TRPM7 im Zellzyklus hervorhebt. Ein auf 10-15 mM Mg<sup>2+</sup> angereichertes extrazelluläres Medium hingegen ermöglichte ihnen eine normale Zellteilung [40].

TRPM7-defiziente B-Zellen, kultiviert in normalem Medium, verharrten in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> oder der frühen G<sub>2</sub> Phase des Zellzyklus. Dies legt nahe, dass der Wachstumsstillstand auf dem mangelnden Vermögen zum Zellwachstum beruht. Es kann angenommen werden, es handle sich nicht um einen Fehler in der DNA-Synthese oder Mitose [40].

Darüber hinaus zeigten Scharenberg et al. bereits, dass TRPM7 eine entscheidende Rolle bei der Proliferation von Lymphozyten spielt. Dabei interagiert TRPM7 mit dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg, welcher eine Rolle im Zellanabolismus und der Steuerrung des Lymphozyten-Stoffwechsels spielt [40]. Conforti et al. konnten weiterhin eine Rolle von TRPM7 bei der Migration von aktivierten T-Lymphozyten nachweisen [41].

Weiterhin gibt es zunehmend Hinweise dafür, dass TRPM7 eine Rolle bei der Entwicklung verschiedener Karzinome spielt [42-46]. Dies konnte bis jetzt insbesondere für Mammakarzinome und Adenokarzinome des Pankreas nachgewiesen werden [45, 47-51]. Dabei wird insbesondere eine Rolle innerhalb eines mechanosensorischen Komplexes diskutiert, welcher im Zusammenhang mit der Metastasenbildung steht [51-53].

### 1.1.6 Regulation der TRPM7-Kanal-Aktivität

TRPM7 ist ein durch Mg<sup>2+</sup> und Mg·ATP inhibierter Kanal, der gleichzeitig Mg<sup>2+</sup> leitet. Daher bilden sowohl Mg<sup>2+</sup> als auch Mg·ATP einen negativen Rückkopplungsmech-

anismus für TRPM7, indem sie die Kanalaktivität durch Bindung an spezifische Stellen regulieren [22, 23, 54].

Nadler et al. konnten zeigen, dass der Kanal konstitutiv offen ist, aber bereits von millimolaren intrazellulären Konzentrationen von  $Mg^{2+}$ ,  $Mg\cdot ATP$  und  $Mg$ -Nukleotiden blockiert wird [23]. Darüber hinaus inhibieren noch andere bivalente Kationen, wie  $Ca^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  die Kanalfunktion. Deren physiologische Konzentrationen liegen allerdings weit unter der Konzentration, die für diese Wechselwirkung notwendig ist. Eine Reduktion dieser zellulären Regulatoren führt zu einer Zunahme der Kanalströme. Daraus kann geschlossen werden, dass TRPM7 die Fähigkeit besitzt, die zytosolischen  $Mg^{2+}/Mg\cdot ATP$  Spiegel zu erkennen und diese Information in eine veränderte TRPM7-Kanalaktivität umzusetzen [22].

TRPM7-Kanalaktivität wird darüberhinaus aktiv durch rezeptorvermittelte Veränderungen im zyklischen AMP (cAMP) und in der Proteinkinase A beeinflusst [55].

Als weitere Modulatoren der TRPM7-Aktivität gelten Lipide, pH-Wert, ATP und andere Nukleotide [56].

Dabei lässt sich zeigen, dass vermehrtes ATP signifikant TRPM7-Ströme erhöht [8]. Dieser Effekt ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass neu gebildetes ATP rasch an  $Mg^{2+}$  gebunden wird und dadurch die Konzentration des freien  $Mg^{2+}$  sinkt [23].

Eine weitere Ursache für diesen Effekt könnte auch der Verbrauch von ATP bei der Erzeugung von  $PIP_2$  sein. Der Entzug von  $PIP_2$ -Molekülen führt zu einer Abnahme der TRPM7-Kanal-Aktivität. Da im Umkehrschluss mehr verfügbares ATP zu mehr Produktion von  $PIP_2$ -Molekülen führt, steigert ATP die TRPM7-Kanal-Aktivität [57].

Auch der pH-Wert hat einen Einfluss auf die TRPM7-Aktivität. So führt eine Erniedrigung des physiologischen pH-Werts von 7,4 auf einen pH-Wert von 4,0 zu einer Erhöhung der TRPM7-Ströme um das 10-fache [58].

Andere Prozesse, wie die schnelle Plasmamembraninsertion von TRPM7, führen zu einer Erhöhung der Aktivität [59]. Weiterhin konnten Oancea et al. die Expression von TRPM7 in glatten Gefäßmuskel-Zellen zeigen. Sie stellten die Hypothese auf, dass TRPM7 durch den Blutfluss in geschädigten Endothelbereichen aktiviert werden könnte [59].

Demeuse et al. konnten zeigen, dass Nukleotide zu einer Inhibition von TRPM7 führen, wobei dies von der Nukleotidbindungsregion in der Kinase-Domäne abhängig ist. Diese Nukleotidbindungsregion arbeitet im Zusammenspiel mit einer  $Mg^{2+}$ -Bindungsstelle außerhalb der Kinase-Domäne [54].

### 1.1.7 Zusammenspiel von Kanal und Kinase

Die Regulation des Kanals durch die Kinase-Domäne wird kontrovers diskutiert.

Matsushita et al. konnten zeigen, dass die Kinase-Domäne eine Rolle bei dem „Trafficking“ oder der Zusammenlagerung des Kanals spielt [29].

Die mit TRPM7 assoziierte Kinase selbst wird vermutlich unabhängig reguliert, obwohl für die Funktionsfähigkeit der Kinase  $Mg^{2+}$  benötigt wird.  $Ca^{2+}$  zeigt hierbei keinen Einfluss und  $Zn^{2+}$  inhibiert die Kinase.  $Mg \cdot ATP$  ist als Energie/Phosphat-Träger für die Phosphorylierung der Substrate und somit für die Kinaseaktivität essentiell. Allerdings zeigen andere Mg-Nukleotide keinen Einfluss [29].

Nadler et al. publizierten, dass die Mutation der ATP-Bindungsstelle in der Kinasedomäne zu einer deutlichen Abnahme der Kanalfunktion führt [23].

Schmitz et al. beschrieben 2003 in *Cell*, dass die TRPM7-Kinase nicht relevant für die Aktivierung des Kanals ist. Sie postulierten jedoch einen funktionellen Zusammenhang, da strukturelle Veränderungen der Kinase die  $Mg^{2+}$ -Sensitivität des Kanals veränderten. Ein Kinase-Deletionsmutante zeigte eine gesteigerte  $Mg^{2+}$ -Sensitivität und somit geringere Kanal-Aktivität [22]. Punkt-Mutanten (K1648R und G1799D), die zu einem Funktionsverlust der Kinase führen, bilden einen funktionierenden Kanal mit hingegen verminderter  $Mg^{2+}$ -Sensitivität. Daher wurde auf eine negative Kopplung zwischen der TRPM7-Kinase und dem Mechanismus der  $Mg^{2+}$  abhängigen Inhibition geschlossen [22].

Matsushita et al. veröffentlichten 2015 eine Publikation mit dem Titel: "Die Kanalfunktion ist von der intrinsischen Kinaseaktivität und von der Autophosphorylierung von TRPM7/CAK1 dissoziiert" (engl. Channel Function is Dissociated from the Intrinsic Kinase Activity and Autophosphorylation of TRPM7/ChaK1\*), welches eine gegensätzliche Position darstellt. Sie identifizierten zuerst die zwei Hauptstellen der Autophosphorylierung mittels Massenspektrometer, um diese dann gezielt zu verändern. Des Weiteren wurden Zellen mit einer Mutation eines

katalytischen Hauptzentrums, welches die Kinaseaktivität aufhebt, untersucht. Bei beiden Verfahren zeigte sich weder eine Veränderung der Kanalaktivität noch ein Unterschied des gemessenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms im Vergleich zur unveränderten Kontrolle. Auch zeigte sich kein Unterschied in der  $\text{Mg}^{2+}$ -Sensitivität gegenüber Wildtyp-Kanälen, gemessen bei 3 mM  $\text{Mg}^{2+}$  in der externen Lösung [29]. Bei einer Konzentration von 3 mM  $\text{Mg}^{2+}$  ist allerdings davon auszugehen, dass beide Kanäle durch die hohe  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration blockiert waren, was die Aussagekraft der Versuche retrospektiv deutlich einschränkt.

Jedoch führte eine Deletion von einem Großteil der C-terminalen Kinase-Domäne zu der Expression eines scheinbar inaktiven Kanals. Daher folgerten sie, die Kinase-Domäne spiele eine strukturelle Rolle in der Kanalanordnung oder der subzellulären Lokalisation [29]. Hingegen zeigten Desai et al. 2012 eine Zunahme des TRPM7-Stroms bei Deletion der gesamten C-terminalen Kinase [60]. Es scheint also von der Stelle der Deletion abzuhängen, wie sich die genetische Veränderung auf die Kanalaktivität von TRPM7 auswirkt.

#### 1.1.8 $\text{Mg}^{2+}$ -Homöostase in Wirbeltieren

Schmitz et al. zeigten mit Hilfe eines genetischen Knockout-Experiments in Hühner-B-Lymphozyten, dass TRPM7-defiziente Zellen  $\text{Mg}^{2+}$ -defizient werden, was durch Zugabe von extrazellulären  $\text{Mg}^{2+}$  wieder aufgehoben werden konnte [22].

Ähnlich führte ein genetischer Knockout der Kinase ( $\text{TRPM7}^{\Delta\text{K}/\Delta\text{K}}$ ) *in vitro* zu einem Arrest im Zellwachstum von embryonalen Stammzellen. Auch dieser Arrest konnte durch hohe Konzentrationen von externem  $\text{Mg}^{2+}$  aufgehoben werden [7]. Verschiedene  $\text{Mg}^{2+}$ -Transporter kompensieren abhängig vom Zelltyp das Fehlen von TRPM7, darunter SLC41A1, SLC41A2 oder möglicherweise MagT1, auch wenn in jüngster Zeit seine Rolle als Mg-Transporter in der Plasmamembran in Frage gestellt wird [61].

Bei gewebespezifischen Deletionen von TRPM7 in T-Lymphozyten von Mäusen lassen sich keine veränderten  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen nachweisen [62]. Eine mögliche Erklärung sind die bereits erwähnten Kompensationsmechanismen durch  $\text{Mg}^{2+}$ -Transporter wie z.B. SLC41A1 [63].

Auch auf der systemischen Ebene konnten Ryazanova et al. Unterschiede in der  $\text{Mg}^{2+}$ -Homeostase nachweisen. Verglichen mit Kontrollmäusen entwickelten heterozygote

Mäuse, die eine Deletion der TRPM7-Kinasedomäne aufwiesen (TRPM7<sup>+/ $\Delta$ K</sup>), eine Hypomagnesämie und zeigten signifikant geringere Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen in Plasma, Urin und Knochen. Als Ursache wird eine mangelhafte Mg<sup>2+</sup>-Absorption im Kolon angenommen. Daraus lässt sich eine entscheidende Rolle von TRPM7 sowohl in der zellulären Mg<sup>2+</sup>-Homöostase, als auch in der Regulation der Ganzkörper-Mg<sup>2+</sup>-Homöostase ableiten [7].

Homozygote TRPM7-Kinase-Knockouts (TRPM7 <sup>$\Delta$ K/ $\Delta$ K</sup>) sind nicht lebensfähig. Da homozygote Mäuse mit einer Punktmutation an der aktiven Stelle der Kinase (TRPM7<sup>KR/KR</sup>) im Gegensatz zu TRPM7-Kinase-Knockouts lebensfähig sind und keine offensichtlichen Veränderungen zeigen, ist anzunehmen, dass die beobachteten Defekte der TRPM7<sup>+/ $\Delta$ K</sup> Mutanten auf eine reduzierte Kanalaktivität zurückzuführen sind.

Die wichtige Rolle der Mg<sup>2+</sup>-Homöostase wird auch durch die Forschungsergebnisse von Chubanov et al. verdeutlicht. Es konnte gezeigt werden, dass die Aufrechterhaltung der Mg<sup>2+</sup>-Balance durch TRPM6 entscheidend für die pränatale Entwicklung und das Überleben bis zum Erwachsenenalter ist. Eine Inaktivierung von TRPM6 in Mäusen führte zu einer verkürzten Lebensspanne, einem Wachstumsdefizit und metabolischen Veränderungen, die auf eine beeinträchtigte Energiebilanz hindeuten [64].

#### 1.1.9 TRPM7 in T-Lymphozyten

Die ersten Hinweise für einen Einfluss von TRPM7 auf das Immunsystem lieferten Schmitz et al., indem sie TRPM7 in DT40-Hühner-B-Zellen genetisch ausschalteten. Die Zellen waren daraufhin nicht weiter vermehrungsfähig, zeigten eine erhöhte Sterberate und einen erniedrigten Mg<sup>2+</sup>-Spiegel [22].

Jin et al. konnten *in vivo* eine wichtige Rolle von TRPM7 in der Entwicklung von T-Zellen identifizieren. Dazu verwendeten sie Mäuse mit einer T-Zell spezifischen Deletion von TRPM7 (*Trpm7*<sup>lox/-</sup> *Lck*-Cre). Diese Knockout-Mäuse zeigten einen Entwicklungsstopp der T-Lymphozyten im doppelt negativen Status (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), resultierend in einer reduzierten Anzahl doppelt-positiver (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) und einfach-positiver (CD4<sup>+</sup>) T-Lymphozyten im Thymus, als auch einer verringerten Anzahl von T-Lymphozyten in der Milz [62]. Die Rolle von TRPM7 in menschlichen T-Zellen ist weitgehend unbekannt.

## 1.2 Das Immunsystem

Der menschliche Körper ist einer Vielzahl von schädlichen äußeren Einflüssen ausgesetzt. Daher besitzt er, neben einer mechanischen und thermischen Schutzhülle, im Laufe der Evolution perfektionierte, leistungsstarke Abwehrmechanismen [65, 66].

Die Mechanismen zur Abwehr von fremden, pathogenen Organismen können in vier Hauptaufgaben strukturiert werden. Zunächst kommt es zur Erkennung potenziell gefährlicher Stoffe [67]. Die umgehende Antwort kommt durch die weißen Blutzellen des angeborenen Immunsystems, später mit der Unterstützung von Lymphozyten des adaptiven Immunsystems, zustande [68].

Um die potenziell pathogenen Mikroben nicht nur zu detektieren, sondern auch zu bekämpfen, hält das Immunsystem eine komplexe Organisation von Immuneffektorzellen bereit. Darunter sind antikörperproduzierende B-Lymphozyten, das Komplementsystem sowie spezifische Leukozyten mit abtötenden Funktionen. Diese verschiedenen Komponenten arbeiten zusammen, um eine Eindämmung und Beseitigung der Infektion zu gewährleisten [69, 70].

Zwei weitere Komponenten sind für das Immunsystem von außerordentlicher Bedeutung. Zunächst einmal die Fähigkeit, ein immunologisches Gedächtnis zu bilden. Dieses wird von verschiedenen Gedächtniszellen übernommen, die nach ausgeheilter Erstinfektion im Blut überdauern. Kommt es zu einer erneuten Infektion, sind sie bereits funktionsfähig, um die Eindringlinge zu bekämpfen. Dies gibt dem Immunsystem die Möglichkeit zu reagieren bevor die Infektion sich im Körper ausbreitet. Das adaptive Immunsystem macht bekannte Angreifer schnell unschädlich, um sich dann auf neue, unbekannte Angreifer zu fokussieren [71, 72].

In den letzten Jahren rückt der vierte Anteil des Immunsystems, die Fähigkeit der Selbstregulation, immer mehr in den Fokus der Forschung. Ist diese Regulation gestört, sind Allergien und Autoimmunkrankheiten die Folge einer exzessiven Immunreaktion. Ein Mangel an regulatorischen Zellen führt ebenfalls zu diesem Effekt.

Das Immunsystem besteht entwicklungsgeschichtlich aus zwei Hauptbereichen, dem evolutionär älteren angeborenen Immunsystem, welches kein vorheriges Priming benötigt, und dem evolutionsgeschichtlich jüngeren adaptiven Immunsystem [71, 72].

### 1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem arbeitet von Geburt an. Es ist nicht nur in der Lage, Bakterien und gefährliche Materialien zu detektieren, sondern ist auch fähig, defekte endogene Zellen, beispielsweise nach einer Virusinfektion, zu identifizieren und zu eliminieren.

Überwinden Pathogene die natürliche Barriere, kommt es, um die Ausbreitung zu verhindern, innerhalb von Minuten zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Dieses bildet mit Hilfe verschiedener Zellen ein komplexes Netz aus Erkennung und Abwehr. Dies beinhaltet zur Erkennung dendritische Zellen und Mastzellen. Zur Abwehr dienen die phagozytischen Effektorzellen, wie Makrophagen und Granulozyten, sowie natürliche Killerzellen. Sie erfüllen ihre Aufgaben mithilfe verschiedener biologisch aktiver Substanzen: Sauerstoffradikale, Zytokine und Enzyme [68, 71, 72].

Dafür nehmen insbesondere dendritische Zellen Antigene auf, prozessieren diese und präsentieren kleine Teile von ihnen an ihrer Oberfläche. Diese kurzen Abschnitte sind an Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle (major histocompatibility complex MHC) gebunden. MHC-Moleküle werden in zwei Klassen unterteilt. MHC-I-Moleküle präsentieren Teile von prozessierten Proteinen aus jeder kernhaltigen Zelle, um Zellerkrankungen und virale Veränderungen zu überwachen. MHC-II dient den Antigenpräsentierenden Zellen, um fremde Antigene zu präsentieren. T-Zellen sind lediglich in der Lage, fremde Antigene in diesem Komplex zu erkennen [71, 72].

### 1.2.2 Das adaptive Immunsystem

T-Lymphozyten und B-Lymphozyten formen gemeinsam das höchstspezifische, erworbene, adaptive Immunsystem. T-Zellen bilden die zelluläre, B-Zellen die humorale immunologische Abwehr. Die Funktionen des adaptiven Immunsystems sind vielfältig und bestehen hauptsächlich aus der spezifischen Abwehr von Antigenen, durch die Möglichkeit ergänzt, ein immunologisches Gedächtnis zu erschaffen. Um verschiedene Antigene zu erkennen, haben sie ein höchst differenziertes Repertoire an individuellen, klonalen Antigen-Rezeptoren. Dieses entsteht durch verschiedene Rekombinationen von Genelementen, verbunden mit zufälligen Mutationen [71].

### *T-Lymphozyten*

T-Lymphozyten besitzen T-Zellrezeptoren und bilden einen wichtigen Teil des erworbenen Immunsystems. Bei Erstkontakt ist das adaptive Immunsystem eher langsam. Es formt jedoch spezifische Gedächtniszellen, die bei Reexposition durch schnelle klonale Expansion Effektorzellen zur Abwehr zur Verfügung stellen.

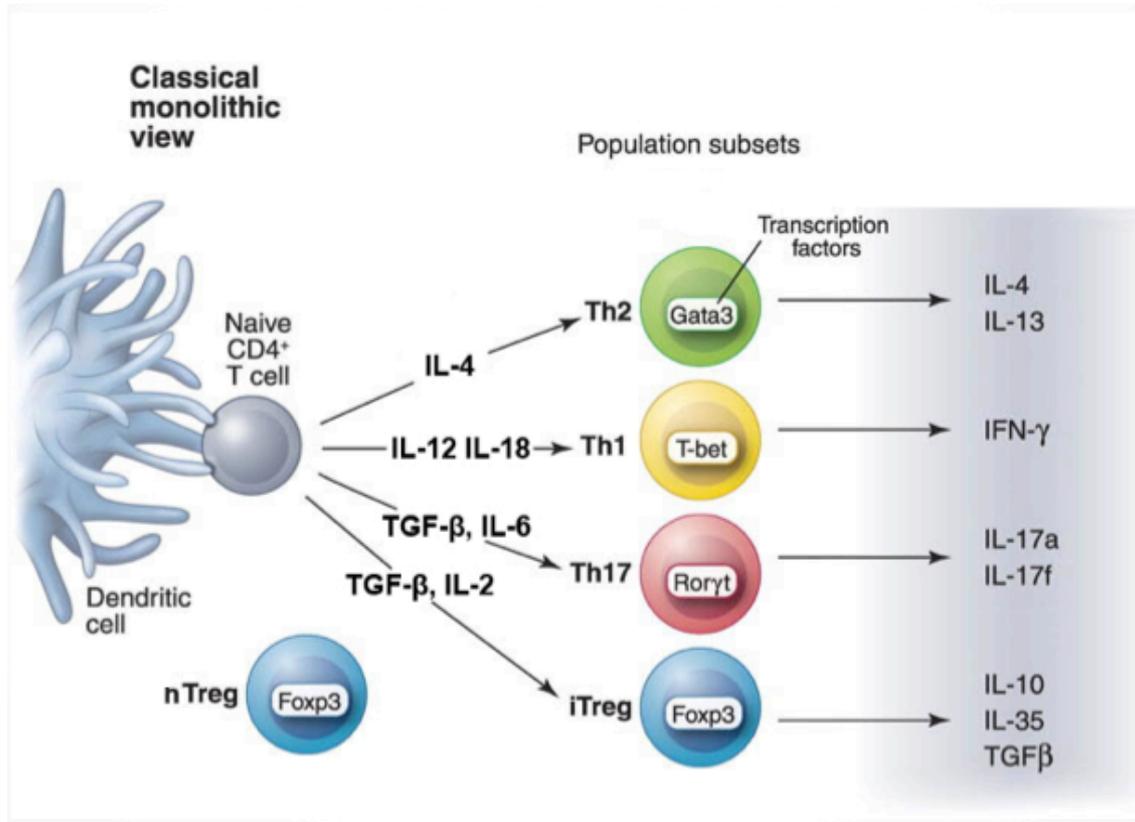
Der Name T-Lymphozyt leitet sich von ihrer Reifung im Thymus ab. In diesem durchlaufen sie verschiedene Selektionsprozesse, die vorbeugend gegen Autoimmunitätsreaktionen wirken. Hier werden sie auch auf ihre vielfältigen Aufgaben vorbereitet [73]. T-Lymphozyten lassen sich in sechs Hauptuntergruppen unterteilen:

| <b>Zelltyp</b>             | <b>Funktion</b>  | <b>Oberflächenmarker</b>   |
|----------------------------|--|--|
| T-Helfer-Zellen            | Zelluläre Immunantwort und humorale Immunantwort je nach Subgruppe                           | CD4 <sup>+</sup>   |
| Zytotoxische T-Zellen      | infizierte Körperzellen anhand von erregertypischen Antigenen zu erkennen und zu eliminieren | CD8 <sup>+</sup> -αβ-Heterodimere                                |
| Gedächtnis T-Zellen        | immunologisches Gedächtnis   | CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup>                            |
| Regulatorische T-Zellen    | Unterdrückung der Aktivierung des Immunsystems   |  |
| Natürliche Killer T-Zellen | wahrscheinlich Kontrolle von Autoimmunerkrankungen   | NKR-P1A, CD56, Neural cell adhesion molecule-1 (NCAM-1) und CD57 |
| Gamma Delta T-Zellen       | erkennen Gewebeschäden und -veränderungen  | T-Zellrezeptor   |

**Tabelle 1: Unterteilung der T-Zellsubtypen.** Dargestellt sind die 6 Hauptuntergruppen mit Funktion und charakterisierenden Oberflächenmarkern.

Die beiden größten Gruppen sind T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen. Zytotoxische T-Lymphozyten sind darüberhinaus als CD8<sup>+</sup> T-Zellen bekannt und interagieren mit dem MHC-I-Komplex, um zum Beispiel durch Viren oder Mutationen modifizierte Zellen zu eliminieren.

Die zweite große Gruppe beinhaltet die T-Helfer-Zellen, die sich durch die Expression des Korezeptors CD4<sup>+</sup> auszeichnen und so den MHC-II-Komplex erkennen können. Diese spielen eine zentrale Rolle in der Unterstützung anderer Leukozyten, einschließlich der Aktivierung von Zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen, und der Reifung der B-Zellen zu Plasma- und Gedächtnis-B-Zellen [71, 72].

*T-Helferzellen*

**Abbildung 3 Die verschiedenen T-Helferzelllinien, ihre Hauptregulatoren und charakteristischen Zytokine.** Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen und natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) reifen im Thymus heran. Je nach extrazellulärem Milieu, differenzieren sie in unterschiedliche Effektor-T-Zellen mit charakteristischen Effektorzytokinen. Modifiziert nach [74].

Die CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen haben keine zytotoxische Aktivität und sind nicht zur Phagozytose fähig. Sie führen zu einer angemessenen Immunantwort, nachdem ihnen ein Antigen von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) an MHC-II-Komplexe gebunden präsentiert wurde. Nach Erkennung spezifischer Antigene schütten T-Helfer-Zellen spezielle Zytokine aus, welche wiederum andere Komponenten des Immunsystems aktivieren. Unter diesen Komponenten befinden sich Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen und zytotoxische Zellen, die wiederum andere Zellen eliminieren können [71, 72].

Verschiedene T-Helfer-Subtypen führen dabei zu unterschiedlichen Immunantworten. Die Klassifikation erfolgt anhand verschiedener ausgeschütteter Zytokine. Diese korrespondieren mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Oberflächenmarkern, was die Detektion von unterschiedlichen Subtypen ermöglicht (siehe Tabelle 2).

| Module                 | Polarizing cytokine(s) | Transcription factor | Homing receptor(s) | Effector cytokine(s) | Target cell   | Function          |
|------------------------|------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|---------------|-------------------|
| <b>T<sub>H</sub>1</b>  | IL-12, IFN             | T-bet                | CXCR3              | IFN-γ                | Macrophages   | <b>Bacteria</b>   |
| <b>T<sub>H</sub>2</b>  | IL-4                   | GATA-3               | CCR4/CRTh2         | IL-4, IL-5, IL-13    | Eosinophils   | <b>Parasites</b>  |
| <b>T<sub>H</sub>17</b> | IL-6, IL-1β, TGF-β     | ROR-γt               | CCR6 / CCR4        | IL-17, IL-22         | Neutrophils   | <b>Fungi</b>      |
| <b>Treg</b>            | ?                      | FOXP3                | CCR7 / CCR6        | TGF-β                | DC / T cells  | <b>Regulation</b> |
| <b>T<sub>FH</sub></b>  | IL-21                  | Bcl-6                | CXCR5              | IL-21                | B cells       | <b>Antibodies</b> |
| <b>Tr1</b>             | IL-10                  | ?                    | CCR7 / CCR6        | IL-10                | T cells       | <b>Regulation</b> |
| <b>T<sub>H</sub>22</b> | IL-6, TNF              | ?                    | CCR6 / CCR10       | IL-22                | Keratinocytes | <b>?</b>          |

Tabelle 2 **CD4<sup>+</sup> T-Zell Module involviert in Abwehr und Regulation.** Gepunktete Linien: mögliche Module für welche relevante Informationen noch fehlen. T<sub>H</sub>1/2/17/22/reg, Helfer T-Zellen-Typ 1/2/17/22/regulatorische; T<sub>FH</sub> Follikuläre Helfer-T-Zellen; Tr1 regulatorischer T-Zellen Typ1; Zitiert aus [75]

Eine perfekte Zuweisung zu individuellen Zellpopulationen ist nicht immer möglich, da einzelne individuelle Zellen Effektorzytokine in verschiedenen Kombinationen produzieren können [76].

Die am besten erforschten Gruppen bilden dabei T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen. T<sub>H</sub>1-Zellen unterstützen die Abwehr gegen intrazelluläre Viren und Bakterien mit Hilfe von IFN-gamma. Extrazelluläre Parasiten werden wiederum mit der Hilfe von T<sub>H</sub>2-Zellen eliminiert [77, 78].

T<sub>H</sub>17-Zellen sind mit inflammatorischen Autoimmunerkrankungen assoziiert und in die Abwehr von Pilzinfektionen involviert [79].

Nachdem das Antigen eliminiert wurde, persistieren zentrale Gedächtniszellen (TCM) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (TEM) im Gedächtnispool, um eine systemische Immunüberwachung zu gewährleisten und bei einer erneuten Infektion zu einer prompten Immunantwort zu führen [75, 80].

Die Gruppe der abwehrunterstützenden T-Zellen wird begleitet von einer weiteren Gruppe der T-Helfer-Zellen, den regulatorischen T-Helfer-Zellen. Diese haben einen regulatorischen Effekt auf das Immunsystem [71, 72].

### 1.2.3 Regulatorische T-Lymphozyten

Regulatorische T-Helfer-Zellen ( $T_{reg}$ ) bilden eine spezielle Untergruppe mit bis zu 10% der T-Helfer-Zellpopulation. In einem gesunden Körper regulieren sie das Immunsystem, indem sie die Immunantwort auf fremde harmlose Antigene unterdrücken [81, 82]. Ihnen kommt darüberhinaus eine entscheidende Rolle in der Prävention von Autoimmunerkrankungen zu [83]. Im Gegensatz dazu können  $T_{reg}$ -Zellen auch bakterielle Infektionen und karzinoide Erkrankungen begünstigen [47, 84-86].

Charakteristische Oberflächenmarker sind CD4 und eine hohe CD25-Expression. CD25 wird jedoch nicht exklusiv auf  $T_{regs}$  exprimiert, sondern auch auf anderen aktivierten T-Zellen. Aus diesem Grund verwendet man zudem den Transkriptionsfaktor FOXP3 zur Identifizierung von  $T_{reg}$ -Zellen [87].

$T_{reg}$ -Zellen können über zwei unterschiedliche Mechanismen entstehen. Natürliche  $T_{reg}$ -Zellen ( $nT_{reg}$ ) werden durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 identifiziert und entwickeln sich im Thymus. Die zweite Gruppe bilden induzierte regulatorische T-Zellen ( $iT_{reg}$ ), welche außerhalb des Thymus unter entsprechenden Umgebungsbedingungen differenziert und redifferenziert werden. Sie tragen genau wie  $nT_{regs}$  den Transkriptionsfaktor FoxP3 [88].

## 1.3 Die Rolle von $Mg^{2+}$ im Immunsystem

Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) ist eines der häufigsten zweiwertigen Kationen in Säugetierzellen und essenzieller Kofaktor von ATP. Es spielt darüber hinaus eine Rolle in vielen Organsystemen. Im Speziellen stellt es, aufgrund seiner anti-inflammatorischen Wirkung, einen entscheidenden Faktor für die Erhaltung der Gesundheit dar.

Der Großteil des körpereigenen  $Mg^{2+}$  ist in den Knochen, Muskeln und Weichteilen gespeichert. Lediglich ein kleiner Teil ist im Serum frei verfügbar. In gesunden Probanden entspricht die  $Mg^{2+}$ -Serumkonzentration zwischen 0,7 und 1,05 mM [89]. Intrazellulär beträgt die  $Mg^{2+}$ -Konzentration 10-30 mM, wobei lediglich 0,5-1,2 mM frei verfügbar sind [90]. Somit ist die freie interne und externe  $Mg^{2+}$ -Konzentration annähernd gleich. **Tabelle 2** zeigt die Kanäle und Transporter, die in den Transport von  $Mg^{2+}$  durch die Membran involviert sind und damit zur  $Mg^{2+}$ -Homöostase beitragen [7].

| Name  | Membrane                    | Expression        | Permeability   | Mechanism           | Disease   | Reference |
|---|-----------------------------|-------------------|----------------|---------------------|---|-----------|
| <i>General Mg<sup>2+</sup>-transporters</i>         |                             |                   |                |                     |   |           |
| TRPM7   | Plasma membrane             | Ubiquitous        | Ba>Ni>Mg>Ca    | Channel             |   | [30]      |
| MagT1   | uncertain                   | Ubiquitous        | Mg>Ba>Fe=Cu    | uncertain           | X-MEN syndrome                                      | [63]      |
| SLC41A1   | Plasma membrane             | Ubiquitous        | Mg>Sr>Fe>Ba>Cu | Exchanger           | Nephronophthisis                                    | [91-93]   |
| SLC41A2   | Golgi membrane              | Ubiquitous        | Mg>Ba>Ni>Ca    | Exchanger           |   | [95]      |
| CNNM3   | Plasma membrane             | Ubiquitous        | Mg>Fe>Cu>Co    | Transporter         |   | [96]      |
| MRS2  | Mitochondrial membrane      | Ubiquitous        | Mg>Ni          | Channel             |   | [97]      |
| <i>Tissue-specific Mg<sup>2+</sup>-transporters</i> |                             |                   |                |                     |   |           |
| TRPM6   | Apical plasma membrane      | Kidney, intestine | Ba>Ni>Mg>Ca    | Channel             | Hypomagnesemia secondary hypocalcemia               | [36]      |
| CNNM1   |                             | Brain             | Cu>Mg          |                     |   | [96, 98]  |
| CNNM2   | Basolateral plasma membrane | Kidney            | Mg>Sr>Zn>Cd    | Transporter, Sensor | Hypomagnesemia with seizures and mental retardation | [99, 100] |
| CNNM4   | Basolateral plasma membrane | Intestine         | Mg             | Exchanger           | Jallili syndrome                                    | [101-103] |

**Tabelle 3: Mg<sup>2+</sup> Kanäle und Transporter.** Kanäle und Transporter, die in den Transport von Mg<sup>2+</sup> involviert sind und damit zur Mg<sup>2+</sup>-Homöostase beitragen. TRPM6/7 Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6/7; MagT1 Magnesium transporter protein 1; SLC41A1/2 Solute Carrier Family 41 Member 1/2; CNNM1/2/3/4 cyclin and CBS domain divalent metal cation transport mediator 1/2/3/4; MRS2 Magnesium Homeostasis Factor Homolog; Entnommen aus [104]

Bereits 1930 konnte man erstmals zeigen, dass  $Mg^{2+}$ -defiziente Ratten zu Entzündungen neigen [105]. Dies war der erste Hinweis auf den Einfluss von  $Mg^{2+}$  auf eine ausgewogene Immunantwort.

Weiterhin wurde gezeigt, dass eine  $Mg^{2+}$ -defiziente Diät in niedrigere IgG- und IgA-Spiegel [106] und eine erhöhte Entzündungsaktivität resultiert [107].

Experimenteller  $Mg^{2+}$ -Mangel in Ratten induziert nach wenigen Tagen ein klinisches Entzündungssyndrom, charakterisiert durch Leukozyten- und Makrophagenaktivierung, Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen und Akute-Phase-Proteinen, sowie übermäßige Produktion von freien Radikalen. Ein Anstieg der extrazellulären Magnesiumkonzentration senkt die Entzündungsreaktion, während die Reduktion von extrazellulärem  $Mg^{2+}$  zu einer Zellaktivierung führt [105].

Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass Magnesium ein natürlicher Kalzium-Antagonist ist. Die molekulare Basis der entzündlichen Reaktion wäre damit wahrscheinlich das Ergebnis der Modulation des Kalziumhaushalts.

Eine Vielzahl von Krankheiten ist auf die Dysregulation des  $Mg^{2+}$ -Metabolismus zurückzuführen.

Mutationen in TRPM6 führen zur familiären Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalziämie (HSH) [12, 13, 36]. Dies resultiert in Elektrolytstörungen kurz nach der Geburt [108].

Li et al. publizierten 2011 eine Arbeit über eine neuartige X-verknüpfte menschliche Immunschwäche aufgrund einer Mutation in dem Gen welches für MagT1, einen vermuteten Magnesiumtransporter, codiert. Diese Störung führt zu einer  $CD4^+$ -Lymphopenie mit entsprechender Immunschwäche.

Basierend auf ihren Erkenntnissen postulieren Li et al. eine "second messenger"-Rolle für  $Mg^{2+}$  in T-Lymphozyten [63].

Dabei ist nicht der Gesamtunterschied zwischen externen und internen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen relevant, sondern schnelle lokale Konzentrationserhöhungen, die durch schnell diffundierende Ionen entstehen. Der Magnesiumeinstrom könnte eine schnelle räumliche Integration von Antigen und kostimulierenden Rezeptorsignalen für die T-Zell-Aktivierung fördern und so als "second messenger" fungieren.

Dies wird in der Literatur allerdings kontrovers diskutiert [109-112]. Da sich die extrazellulären (0,7-1,05 mM) und intrazellulären (0,5-1,2 mM) Konzentrationen für  $Mg^{2+}$  nicht maßgeblich unterscheiden, spielt  $Mg^{2+}$  als Signalmolekül vermutlich eher eine untergeordnete Rolle, z.B. im Vergleich zu Kalzium.

#### 1.4 Hypothese und Projektziele

Die entscheidende Rolle von Magnesium in Entzündungsreaktionen und der Einfluss der bereits für andere Magnesiumkanäle gezeigt wurde, wirft die Frage auf, welche Bedeutung das ubiquitär vorhandene TRPM7 bei der immunologischen Antwort hat.

Insbesondere T-Lymphozyten spielen bei Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle.

Schenk et al. postulierten die purinerge Kontrolle der T-Zellaktivierung durch ATP-Freisetzung durch Pannexin-1-Hemichannels [113]. Damit zeigten Sie, dass ATP einen Einfluss auf die Aktivierung und Funktionsfähigkeit von T-Zellen hat. Basierend auf diesen Eigenschaften wird gegenwärtig angenommen, dass TRPM7 einen ubiquitären homeostatischen Mechanismus repräsentiert, der  $Ca^{2+}$ - und  $Mg^{2+}$ -Ströme basierend auf dem metabolischen Zustand der Zelle reguliert.

Physiologisch könnte der Kanal als regulierender Mechanismus für Ionen dienen, welche Einfluss auf Zelladhäsion, Zellwachstum, Proliferation und sogar Zelltod unter physiologischem Stress haben [55].

Eine mögliche Erklärung für die Funktion dieses Mechanismus wären die unterschiedlichen Anforderungen von ruhenden und sich teilenden Zellen. Zellen im Ruhezustand optimieren ihren Zellmetabolismus, um Glukose zum Recycling von existierendem  $Mg \cdot ADP$  zu  $Mg \cdot ATP$  zu nutzen. Sich teilende Zellen starten im Kontrast dazu den Pentose-Phosphat-Weg, um Substrate zur Zellmassegewinnung zu generieren. Dies geht einher mit einer ausgeprägten de-novo-Synthese von ATP. Jedes neu gebildete ATP bedarf eines neuen  $Mg^{2+}$ , importiert aus dem extrazellulären Milieu. Es erscheint sinnvoll,  $Mg^{2+}$ -Aufnahme und Biosynthesestoffwechsel zu koppeln. Es könnte daher sein, dass TRPM7 eine Schalterfunktion besitzt. Ist die  $Mg^{2+}$ -Aufnahme limitiert, kommt es zur Abschaltung des Wachstumspfad und zur Konzentration auf die ATP-Regeneration. Ist die  $Mg^{2+}$ -Aufnahme aktiv, ist der Schalter an und der zelluläre

Kohlenstofffluss konzentriert sich auf die Synthese neuer Biomoleküle, einschließlich neuem Mg·ATP [40].

Wenn die ATP-Synthese in bestimmten T-Zellsubtypen erhöht oder reduziert wird, beeinflusst dies die intrazelluläre Verfügbarkeit von  $Mg^{2+}$ , was sich wiederum auf die TRPM7-Ionenkanalaktivität auswirken könnte.

## 1.5 Projektziele

Um den Einfluss von  $Mg^{2+}$  und TRPM7 auf die immunologischen Prozesse besser nachvollziehen zu können, schlugen wir vor, die Expression von TRPM7 und seine Rolle bei der Differenzierung und Aktivierung von  $CD4^+$  T-Lymphozyten zu untersuchen. Dabei lag das Interesse in der Beantwortung von zwei Hauptfragen:

- Ist die TRPM7 Expression und/oder Aktivität in T-Lymphozyten-Subgruppen unterschiedlich?
- Welche Rolle spielen  $Mg^{2+}$  und TRPM7 bei der Differenzierung verschiedener T-Lymphozyten-Subtypen?

Dafür analysierten wir die Expressionslevel, Funktion und Regulation von TRPM7 in humanen T-Lymphozyten unter Verwendung von molekularen und biochemischen Assessments, Ganzzell-Elektrophysiologie sowie bildgebenden Verfahren.

Im Speziellen waren wir an dem möglichen Unterschied der TRPM7-Aktivität zwischen regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) und differenzierten proentzündlichen T-Zellen ( $T_H1$  und  $T_H17$ ) interessiert. Um verschiedene T-Zell-Untergruppen zu generieren, wurden naive T-Zellen isoliert und entsprechend stimuliert. Die Differenzierung war gefolgt von einer durchflusszytometrischen Analyse.

Unsere Ergebnisse sollen zu einem besseren Verständnis der Beteiligung von TRPM7 bei der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen führen.

Dies könnte bei der Identifizierung neuartiger Arzneimittel helfen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Spenderblut gesunder Probanden

Die T-Lymphozyten wurden für jedes Experiment frisch isoliert. Mit Heparin-NaCl-Lösung (100 Units Heparin/ml NaCl) versetzte Blutproben gesunder, auf Infektionskrankheiten getesteter Patienten wurden freundlicherweise durch Prof. Dr. Schulze-Koops bereitgestellt.

Die anschließende Isolation verschiedener T-Lymphozyten-Subtypen erfolgte mit Hilfe verschiedener Methoden.

#### 2.1.2 Isolation von T-Lymphozyten

*Tabelle 4 Materialien für die Isolation von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen.*

| <b>Substanz</b>   | <b>Hersteller</b>           |
|---|-----------------------------|
| BSA   | Carl Roth                   |
| CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit human      | MACS Miltenyi Biotec        |
| EDTA  | Sigma-Aldrich, Deisenhofen  |
| FCS   | Life Technologies, Carlsbad |
| Ficoll- Lymphoflot –Density gradient for isolation of lymphocytes REF 824 012 | Bio-rad, Hercules           |
| Naïve CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II human                          | MACS Miltenyi Biotec        |
| NH <sub>4</sub> Cl  | Sigma-Aldrich, Deisenhofen  |
| PBS   | Sigma-Aldrich, Deisenhofen  |
| RPMI  | Sigma-Aldrich, Deisenhofen  |
| Schaferythrozyten   | Liebig Nährstofftechnik     |

*Schaferythrozyten*

Die reinen Schaferythrozyten wurden von der Firma Liebig Nährstofftechnik bezogen. Um eine höhere Reinheit zu gewährleisten, wurde zweimal bei einer Zentrifugengeschwindigkeit von 1031 RCF mit PBS gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgte bis zu einem Monat lang in einer RPMI/L-Glutamin Lösung bei 4 °C.

*Ammoniumchloride*

1:100 NH<sub>4</sub>Cl in Bideistwasser versetzt mit 1 mM EDTA.

*MACS-Puffer*

500 ml PBS, 2.5 g BSA, 2 ml 0.5 M EDTA wurden kombiniert und nach steriler Filtration bei 4 °C gelagert.

## 2.1.3 Materialien zur Durchführung der Durchflusszytometrie

*Tabelle 5 Materialien zur Durchführung der Durchflusszytometrie*

| <b>Material</b>            | <b>Hersteller</b>    |
|----------------------------|----------------------|
| FCR blocking reagent human | MACS Miltenyi Biotec |
| Mouse serum                | Biolegend, San Diego |
| FoxP3 staining kit         | Biolegend, San Diego |
| CD4 APC human              | Biolegend, San Diego |
| CD8 PerCP human            | Biolegend, San Diego |
| CD25 PE human              | Biolegend, San Diego |
| FoxP3 Alexa 488            | Biolegend, San Diego |

*FACS-PBS*

500 ml PBS, 10 ml FCS und 500 µl 10% NaN<sub>3</sub> wurden kombiniert und nach steriler Filtration bei 4°C gelagert.

*10% Stocksolution NaN<sub>3</sub>*

2 g NaN<sub>3</sub> wurde zu 20 ml PBS hinzugefügt.

*Tabelle 6 Materialien für die Zellkultur, Differenzierung und TRPM7-Blockierung.*

| <b>Substanz</b>                 | <b>Hersteller</b>              |
|---------------------------------|--------------------------------|
| RPMI                            | Sigma-Aldrich, Deisenhofen     |
| L-Glutamine                     | Sigma-Aldrich, Deisenhofen     |
| Penicillin-Streptomycin         | Sigma-Aldrich, Deisenhofen     |
| NHS (normales humanes Serum)    | Schulze Koops, LMU München     |
| Human IL2                       | RD Systems, Minneapolis        |
| Anti- $\alpha$ CD3/28 Dynabeads | Life Technologies, Carlsbad    |
| TGF-beta                        | Bio Rad/ RD Systems            |
| Retinoic acid                   | Sigma-Aldrich, Deisenhofen     |
| MgSO <sub>4</sub>               | Sigma-Aldrich, Deisenhofen     |
| Waixenicin A                    | David Horgen, HPU, Hawaii, USA |
| NS8593                          | Sigma-Aldrich, Deisenhofen     |
| Spingosin                       | Sigma-Aldrich, Deisenhofen     |
| Spingosinphosphat               | Sigma-Aldrich, Deisenhofen     |

*RPMI-Aufbereitung*

500 ml RPMI 1640 wurden mit 5.0 ml L-Glutamin und 2.5 ml Penicillin-Streptomycin versetzt.

*Vorbereitung Waixenicin A*

50  $\mu$ g gefriergetrocknetes Waixenicin A wurde in 120  $\mu$ l Ethanol gelöst. Die weitere Verdünnung erfolgt mit dem entsprechendem Versuchsmedium. Die finalen Konzentrationen betragen 6, 10 bzw. 30  $\mu$ M.

*Tabelle 7 Patch-Lösungen und Oberflächenschichtungen*

| <b>Substanz</b> | <b>Hersteller</b>          |
|-----------------|----------------------------|
| CsGlu           | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| EDTA            | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |

|                 |                            |
|-----------------|----------------------------|
| EGTA            | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Glukose         | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| CaCl            | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| L-Glutamic Acid | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Cesium OH       | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |

### *Beschichtung der Deckgläser*

Die verwendeten Deckgläser wurden für 15 min mit Poly-D-Lysoin beschichtet, gewaschen und danach bei Raumtemperatur gelagert.

*Tabelle 8 Ø Mg-Cs-Glutamat-Ringer (200mL)*

| <b>Substanz</b>   | <b>Konzentration</b> |
|-------------------|----------------------|
| CS-Glutamate      | 120 mM               |
| NaCl              | 8 mM                 |
| MgCl <sub>2</sub> | 1 mM                 |
| Hepes-CsOH        | 10 mM                |

Zur Einstellung des pH auf 7.20 mit einer annähernden Osmolarität von 292 osmol/l wurde CsOH verwendet.

*Tabelle 9 120mM Mg und Mg-ATP-freie interne Lösung*

| <b>Substanz</b>           | <b>Konzentration</b> |
|---------------------------|----------------------|
| Ø Mg-Cs-Glutamate Ringer  | 102 mM               |
| 100mM EDTA in Cs-Glutamat | 5 mM                 |
| 100mM EGTA in Cs-Glutamat | 10 mM                |

*Tabelle 10 Ø Ca-Sodium Ringer (1L)*

| <b>Substanz</b>   | <b>Konzentration</b> |
|-------------------|----------------------|
| NaCl              | 140 mM               |
| KCL               | 2.8 mM               |
| MgCl <sub>2</sub> | 2 mM                 |
| Hepes-NaOH        | 10 mM                |

*Tabelle 11 Externe Lösung mit 2mM Mg<sup>2+</sup>*

| <b>Substanz</b>                      | <b>Konzentration</b> |
|--------------------------------------|----------------------|
| Glucose                              | 11.08 mM             |
| Filtert $\emptyset$ Ca-Sodium Ringer | 140 mM               |
| 1M CaCl <sub>2</sub>                 | 1 mM                 |

*Tabelle 12  $\emptyset$  Mg<sup>2+</sup>  $\emptyset$  Calcium-Sodium Ringer (500ml)*

| <b>Substanz</b> | <b>Konzentration</b> |
|-----------------|----------------------|
| NaCl            | 140 mM               |
| KCL             | 2.8 mM               |
| Hepes-NaOH      | 10 mM                |

*Tabelle 13 Mg<sup>2+</sup>-freie externe Lösung*

| <b>Substanz</b>   | <b>Konzentration</b> |
|---|----------------------|
| Glucose   | 11.06 mM             |
| Filtert $\emptyset$ Mg <sup>2+</sup> - $\emptyset$ Calcium-Natrium Ringer | 140 mM               |
| CaCl <sub>2</sub>   | 2.84 mM              |

*Physiologische externe Lösung*

140 mM NaCl, 5 mM CsCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Glukose, 10 mM HEPES, pH-Einstellung auf 7.4 mit NaOH. Die Cs<sup>+</sup>-basierte externe Badlösung enthält 130 mM CsCl, 50 mM Mannitol, 10 mM HEPES, pH-Einstellung auf 7.4 erfolgte mit CsOH.

*Tabelle 14 Zweiwertige-Ionen-freie Lösung*

| <b>Substanz</b>  | <b>Konzentration</b> |
|--|----------------------|
| 140 mM Mg <sup>2+</sup> -freie externe Lösung ohne CaCl <sub>2</sub> | 140 mM               |
| 100 ml EDTA in Cs-Glutamat   | 5,0 mM               |

*Tabelle 15 Materialien zur Fixierung von humanen T-Lymphozyten auf Deckgläschen*

| <b>Material</b>                   | <b>Hersteller</b>          |
|-----------------------------------|----------------------------|
| PFA                               | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Poly-D-Lysine Hydrobromide        | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Deckgläschen (24 x 60 mm, ø12 mm) | Menzel, Braunschweig       |

Die Zellen wurden auf mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät. Nach einer Ruhezeit von 30 min bei 37°C wurden die Zellen mit 2 % PFA (37 °C) in PBS fixiert. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei Raumtemperatur. Um überschüssiges PFA zu entfernen wurden die Deckgläschen drei mal mit PFA gewaschen.

| <b>Material</b>                       | <b>Hersteller</b>              |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| Glaspipetten GB150TF-8P               | Science Products GmbH, Hofheim |
| Deckgläschen (24 x 60 mm, ø 12 mm)    | Menzel, Braunschweig           |
| Petrischalen (ø 35 mm, 60 mm, 100 mm) | Sarstedt, Nümbrecht            |

#### 2.1.4 Immunfärbung von TRPM7

*Tabelle 16 Materialien für die Immunfärbung zur Fluoreszenzmikroskopie*

| <b>Material</b>   | <b>Hersteller</b>                   |
|---|-------------------------------------|
| PFA   | Sigma/ Electron Microscopy Sciences |
| Triton X-100  | Sigma-Aldrich, Deisenhofen          |
| FcR blocking reagent human<br>(FcR-Blockierungsreagenz) | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach  |
| Normal goat serum (Normales Ziegen Serum)               | Life Technologies, Carlsbad         |
| BSA   | Carl Roth, Karlsruhe                |
| rabbit $\alpha$ TRPM7, Alomone #ACC-047                 | Alomone, Jerusalem                  |
| Alexa Flour goat $\alpha$ rabbit, 488nm                 | Life Technologies, Carlsbad         |
| Mounting Media (Eindeckmedium)                          | Dako/ Agilent, Santa Clara          |

## 2.1.5 Geräte

| <b>Gerät</b>                                     | <b>Firma</b>                                  |
|--|---|
| Inkubator HeraCell 240                           | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)       |
| Konfokales Laser Scanning Mikroskop (LSM 880)    | Zeiss, Jena                                   |
| Lichtmikroskop Axio Vert A1                      | Zeiss, Jena                                   |
| Lichtmikroskop CKX41 mit Kamera SC20             | Olympus, Hamburg                              |
| Mikrowelle                                       | Severin, Sundern                              |
| Patch Clamp Verstärker EPC 10                    | HEKA, Lambrecht                               |
| pH-Meter FiveEasy plus                           | Mettler-Toledo, Gießen                        |
| Pipetten (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) | Peqlab, Erlangen                              |
| Osmometer Vapro 5600                             | Wescor, Puteaux (Frankreich)                  |
| Pipetten-Puller DMZ Universal                    | Zeitz, München                                |
| Guava easyCyte Durchflusszytometer 5             | Merck Millipore, Billerica (USA)              |
| Sterilbank HERAsafe                              | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)       |
| Tiefkühlschrank -80°C                            | New Brunswick Scientific (Eppendorf), Hamburg |
| Tischzentrifuge (Biofuge Pico 17)                | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)       |
| Ultrazentrifuge (UZ) Beckmann XL-90              | Beckmann-Coulter, Krefeld                     |
| Ultrazentrifugenrotoren SW40 Ti                  | Beckmann-Coulter, Krefeld                     |
| Vortexer MS3 Basic                               | Ika, Staufen                                  |
| Waage EG 620-3NM                                 | Kern, Balingen                                |
| Wärmeschrank UFE 600                             | Memmert, Schwabach                            |
| Wasserbad WNE 14                                 | Memmert, Schwabach                            |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 T-Lymphozyten Isolation

Der Isolierungsprozess von T-Lymphozyten erfolgte in mehreren Schritten.

#### *Isolierung von peripheren mononukleären Zellen*

Der erste Schritt besteht in der Isolation von PBMCs (Periphere Blut Mononukleare Zellen) durch Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisiertem Vollblut. Entsprechend ihrer spezifischen Dichte sammeln sich Lymphozyten und Monozyten in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/Thrombozyten) und Ficoll-Hypaque an. Das Zellsediment bilden Erythrozyten und Granulozyten, welche eine höhere Dichte besitzen.

Für die Isolation wurde das durch Heparin ungerinnbar gemachte Blut in mehrere Falcon aufgeteilt. 50 ml Lymphoflot pro Falcon wurden verwendet, um eine Dichtegradientenzentrifugation durchzuführen. Die Zentrifugationsgeschwindigkeit war dabei auf 397 RCF ohne Bremse eingestellt. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase mit den Lymphozyten und Monozyten gewonnen und zweimal mit 50 ml PBS gewaschen (5 min bei 720 RCF). Danach wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Um die PBMCs weiter zu differenzieren wurde ein Rosettierungs-Protokoll durchgeführt.

#### *Trennung von T- und B-Lymphozyten*

Die Rosettierung mit Schaferythrozyten beruht auf dem Prinzip, dass T-Lymphozyten im Gegensatz zu B-Zellen über das Oberflächenmolekül CD2 verfügen. Dieses kann an das Adhäsionsprotein (CD58) binden, das in großer Zahl auf Schaferythrozyten vorhanden ist. Durch die Verbindung lagern sich T-Zellen rosettenförmig an die Schaferythrozyten an. Die neugebildeten Rosetten haben eine insgesamt höhere Dichte und lassen sich daher mit Hilfe einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation von den restlichen Leukozyten separieren.

Die zuvor gesammelten PMBCs wurden im Verhältnis 1:1 mit einer Suspension aus Schaferythrozyten und FCS (fetal calf serum – deu. fetales Kalbsserum) vermischt.

Nach 10 min Inkubation bei 37 °C wurde mit 254 RCF für 10 min bei 15 °C zentrifugiert. Danach folgte eine 45 minütige Inkubation bei 4 °C.

Danach wurde eine erneute Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Die nicht in Rosetten gebundenen Leukozyten bildeten weiterhin die Interphase zwischen Ficoll und Überstand, während sich die Rosetten im Sediment befanden. Dadurch war eine erste Separation der T-Lymphozyten von den restlichen Leukozyten möglich.

Die Abtrennung der T-Lymphozyten von den Erythrozyten wurde durch Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  erreicht.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  lysiert die kernlosen Erythrozyten schneller als die verbleibenden T-Lymphozyten. Die Inkubation mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  wurde beendet, wenn die Lösung aufgrund der Zerstörung der Erythrozyten durchsichtig geworden war. Die verbleibenden Zellbestandteile wurden mit 50 ml PBS ausgewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 720 RCF).

#### *Magnetische Separation von T-Lymphozyten*

Für die Aufreinigung der verbleibenden Rosetting-positiven Zellen und zur Auftrennung verschiedener T-Lymphozyten Populationen wurde ein magnetisches Separationsverfahren (MACS, *magnetic cell sorting*) verwendet. Dieses Verfahren ist möglich, da die Phänotypisierung verschiedener Subpopulationen mittels Bestimmung populationspezifischer Zelloberflächenproteine (Clusters of Differentiation oder CD-Marker) erfolgt. Diese lassen sich durch spezifische Antikörper identifizieren und mit magnetischen Kügelchen (Beads) verbinden. Mit Hilfe einer magnetischen Separation ist es dann möglich, diese spezifischen Zellen zu isolieren.

Die folgende Beschreibung der Isolation von  $T_{\text{reg}}$ -Zellen ist ein Beispiel für die von mir angewendete Isolation einzelner Subtypen.

Das Isolationsprozedere bestand aus zwei Schritten. Zuerst wurden CD4 negative T-Lymphozyten mit einem Cocktail aus Biotin-konjugierten Antikörpern gegen CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR $\gamma/\delta$  und CD235a (Glycophorin A) und Anti-Biotin MicroBeads markiert. Die markierten Zellen wurden anschließend über einer MACS-Säule aufgetrennt. Dabei verbleiben alle markierten Zellen in der Säule, die sich in einem magnetischen Feld befindet. Alle unmarkierten Zellen verlassen die Säule der Schwerkraft folgend. Die Durchflussfraktion enthält die  $\text{CD4}^+$  Lymphozyten.

Für den ersten Schritt der MACS-Auftrennung wurden die Rosetting-positiven Zellen gezählt und mit MACS-Puffer in Suspension gebracht. Dafür wurden die Zellen bei 720 RCF für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 90 µl MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen resuspendiert. Es wurden 10 µl  $CD4^+$ -T-Cell-Biotin-Antibody-Cocktail pro  $10^7$  Zellen hinzugegeben, gut gemischt und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden 20 µl Anti-Biotin MicroBeads pro  $10^7$  Zellen hinzugegeben, erneut gut gemischt und weitere 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Es folgte die magnetische Trennung der  $CD4^+$ -Zellen. Hierzu verwendete ich eine LD-Säule. Die LD-Säule wurde ins magnetische Feld eingebracht und mit 2 mL MACS-Puffer gespült. Danach wurde die Zellsuspension aufgetragen. Die unmarkierten Zellen wurden unterhalb der Säule aufgefangen und die Säule 2 mal mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen. Die unmarkierten Zellen bildeten die vorangereicherte  $CD4^+$ -Fraktion.

In einem zweiten Schritt wurden die vorangereicherten  $CD4^+$ -T-Lymphozyten nach gleichem Protokoll mit CD25-MicroBeads für die nachfolgende Positivselektion von  $CD4^+CD25^+$  natürlichen regulatorischen T-Lymphozyten markiert. Die Auftrennung erfolgte mit einer MS-Säule und die gewonnenen Zellen wurden erneut durch eine zweite MS-Säule aufgetrennt, um eine höhere Reinheit der  $CD25^+$ -Fraktion zu erzielen.

Da es sich um eine Positivselektion handelte, wurde die Durchflussfraktion von den  $CD25^-$ -Lymphozyten gebildet. Die  $CD25^+$ -Lymphozyten wurden durch das angelegte Magnetfeld in der Säule zurückgehalten und konnten nach Entfernung der Säule aus dem Magneten durch einfaches Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule gelöst werden.

### 2.1.2 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie können verschiedene Zelleigenschaften mit Hilfe eines Lasers erkennbar gemacht werden. Zu diesem Zweck werden Zellen in eine Suspension gebracht und fließen in einem kontinuierlichen Fluss an zwei Lasern vorbei. Die Laser arbeiten mit unterschiedlichen Wellenlängen (488 nm und 532 nm). Die Strahlung wird von den Zellen in unterschiedlichem Umfang reflektiert und wird von speziellen Detektoren aufgenommen und an einen Computer weitergeleitet.

Für eine gezielte Analyse von sowohl intra-, als auch extrazellulären Antigenen werden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern markiert, wobei sichergestellt werden

muss, dass sich die Fluoreszenzspektren von den verschiedenen markierten Zielmolekülen nicht überschneiden.

#### *Zelloberflächenfärbung*

Ich verwendete  $10^6$  Zellen in 90  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer und gab 10  $\mu\text{l}$  FcR-Blocking-Reagenz dazu um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach 10 min Inkubation bei 4 °C wurden 5  $\mu\text{l}$  Fluoreszenzantikörper hinzugegeben und die Lösung für 20 min auf Eis inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (5 min bei 720 RCF) mit FACS-Puffer wurden die Zellen bis zur Analyse in FACS-Puffer auf Eis gelagert.

#### *Intrazelluläre Färbung von Transkriptionsfaktoren*

Die intrazelluläre Färbung verläuft in drei Schritten, bestehend aus Fixierung der Zelle, Perforation der Zellmembran und Färbung der internen Transkriptionsfaktoren. Die intrazelluläre Färbung wurde mit dem entsprechenden Biolegend kit durchgeführt.

Das Kit stellt einen Fix/Perm Puffer und einen Perm-Puffer zur Verfügung. Beide wurden nach Firmenanleitung zubereitet.

Die Zellen wurden in 1 ml Fix/Perm-Lösung resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erst mit FACS-Puffer und dann mit Perm-Puffer gewaschen (5 min bei 720 RCF). Es folgte eine 15-minütige Inkubation in Perm-Puffer bei Raumtemperatur. Zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen wurde Mäuseserum bis zu einer Konzentration von 4 % hinzugegeben und für weitere 15 min bei 4 °C inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden ohne vorherigen Waschschrift 5  $\mu\text{l}$  Antikörper hinzugefügt und für weitere 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Um überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen zwei weitere male mit FACS-Puffer gewaschen.

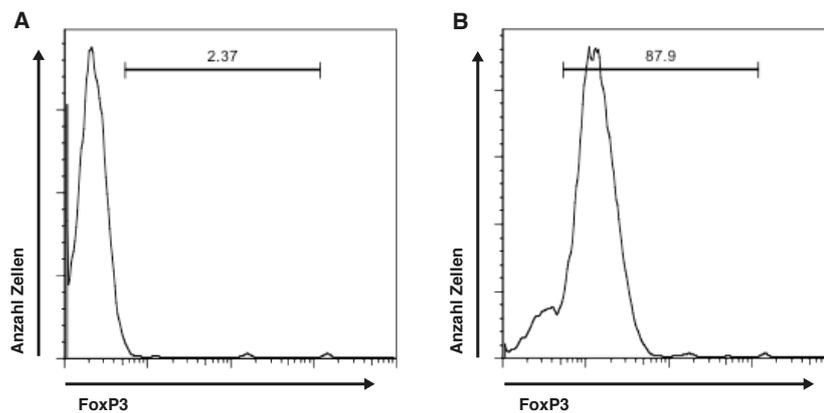
#### *Färbung von regulatorischen T-Lymphozyten*

Zur Reinheitskontrolle färbte ich die T-Helferzellen als Positivkontrolle auf CD4 und, um etwaige Verunreinigung mit zytotoxischen T-Zellen auszuschließen, auf CD8 als Negativkontrolle.

Die isolierten T<sub>reg</sub>-Zellen wurden zur Kontrolle auf intrazelluläres FoxP3 (Forkhead box protein) und CD25 gefärbt.

### 2.2.2 Durchflusszytometrische Analyse

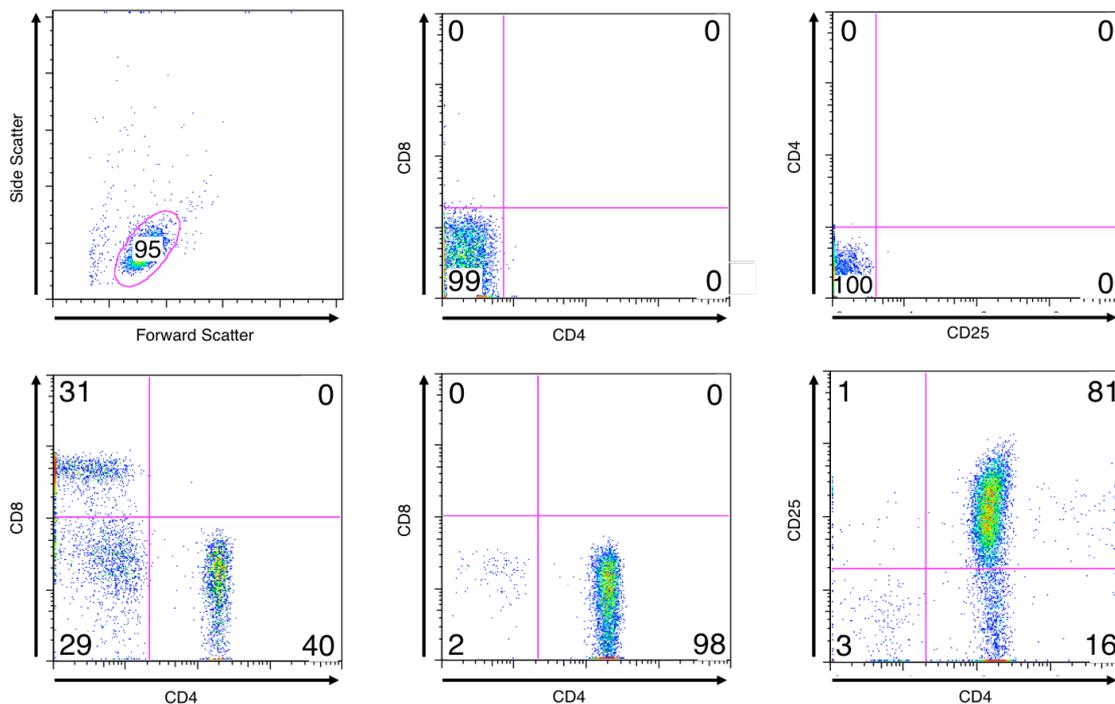
Die Durchflusszytometrische-Analyse erfolgte mit der firmeneigenen Software von Millipore (InCyte). Die Gates für FoxP3 wurden nach dem entsprechenden Isotyp eingestellt. Die Grenze wurde auf < 3% positive Zellen im Isotyp gesetzt.



**Abbildung 4 FACS Analyse von nT<sub>regs</sub> nach Isolation aus Vollblut.** Representative Histogramme: die Färbung erfolgte A) via Isotyp und B) mit Fluoreszenzfarbstoff markiertem Anti-FoxP3 Farbstoff.

Zur Färbung mit den Oberflächenmarkern CD4/8/25 wurde als Referenz eine nicht gefärbte Negativkontrolle verwendet.

Der Reinheitsgrad der isolierten naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen lag zwischen 95-99 % (siehe exemplarisch **Abbildung 4**). Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, denen kein Fluoreszenzfarbstoff während des Färbeprozesses hinzugefügt wurde.

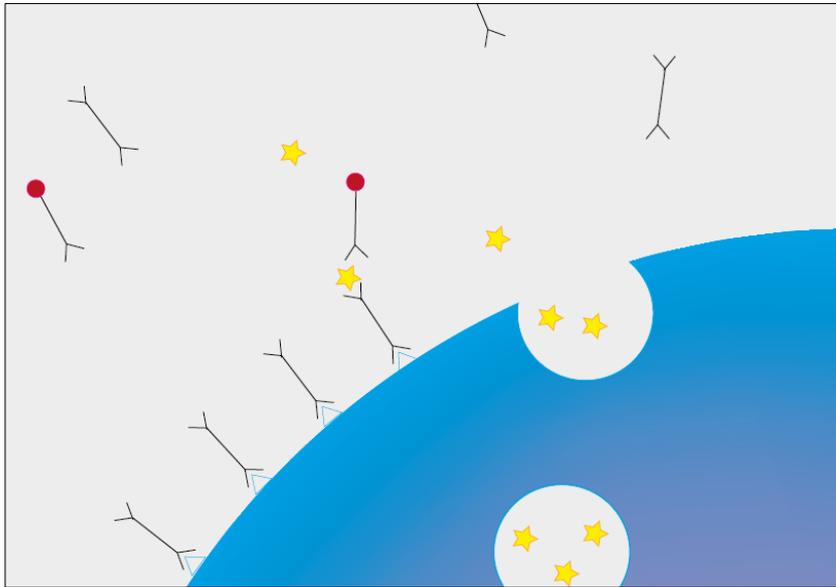


**Abbildung 5 FACS Analyse während der Isolation aus Vollblut.** A) Representativer Punkteplot von PBMCs. B/C) Representativer Punkteplot PBMC ungefärbt. D) Representativer Punkteplot PMBCs, Färbung erfolgte via, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter, Anti-CD4 und Anti-CD8 Antikörper. B) Representativer Punkteplot von  $CD4^+$  positiven Lymphozyten. Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen CD25 und CD4 Oberflächenmarker. E) Representativer Punkteplot  $CD4^+ CD25^+$  positiven Lymphozyten. Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen CD25 und CD4 Oberflächenmarker.

Die Isolation von natürlichen  $T_{reg}$ -Zellen ( $nT_{reg}$ ) stellte sich als weit empfindlicher heraus, mit Ergebnissen im Bereich von 30-85 % erreichter Reinheit, bestätigt mit intrazellulärer FoxP3 Färbung (siehe **Abbildung 5**). Die Ergebnisse konnten durch eine Wiederholung der magnetischen Separation in Teilen verbessert werden. Um angemessene Ergebnisse zu gewährleisten, wurde der Cutoff bei 80 % Reinheit gesetzt. Alle Zellen, die eine Reinheit von unter 80% zeigten, wurden verworfen.

$T_H1$ - sowie  $T_H17$ -Zellen wurden durch unseren Kooperationspartner Prof. Dr. Schulze-Koops bereitgestellt. Die naiven  $CD4^+$  T-Zellen wurden dafür von Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe isoliert und mit Interleukinen und Zytokinen stimuliert. Danach erfolgte ein Cytokine-Capture-Assay mit anschließendem FACS-Sorting, um eine möglichst reine T-Zell-Subpopulation zu erlangen.

### 2.2.3 $T_H1$ - und $T_H17$ -Differenzierung und Isolation mit Hilfe des “Cytokine-Capture-Assays” in Kooperation mit Prof. Dr. Schulze-Koops und PD Dr. Skapenko



**Abbildung 6 Schematische Darstellung der Funktionsweise des verwendeten Capture-Assays.**

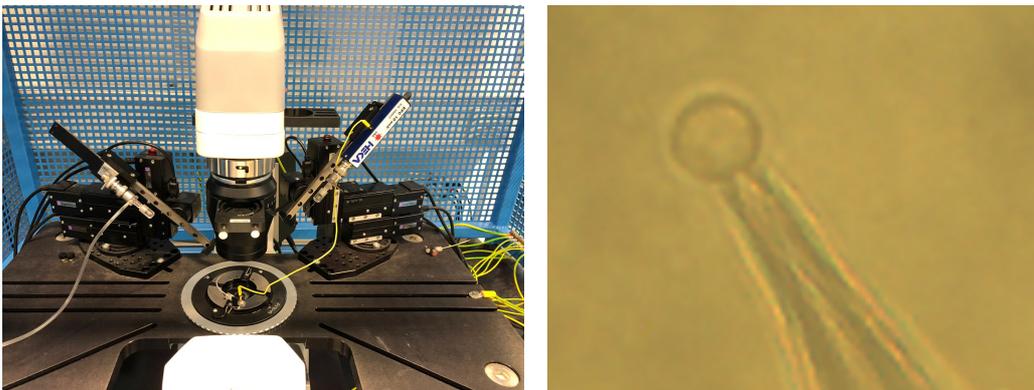
Zugefügte Antikörper binden gleichzeitig an die Zelloberfläche und an einer zweiten Bindungsstelle von der Zelle exprimierte Stoffe. Diese werden durch einen zweiten zugeführten Antikörper markiert. Dieses Verfahren ermöglicht, Zellen nach ihren exprimierten Zytokinen zu sortieren.

Die Schwierigkeit in der Phänotypisierung und Isolation verschiedener Subpopulationen von T-Lymphozyten liegt in der Differenzierung der Zellen, ohne diese in ihrer Funktion zu beeinträchtigen oder gar zu zerstören. Dieses bisher nur durch Detektion von spezifischen Zelloberflächenmolekülen (Clusters of Differentiation oder CD-Marker) möglich.

Diese Methode wird seit einiger Zeit durch die Möglichkeit eines „Cytokine-Capture-Assays“ ergänzt. Dieser basiert auf Antikörpern, die eine Bindung mit der Oberfläche aller Lymphozyten eingehen. Die Antikörper besitzen darüberhinaus spezifische Bindungsstellen für Zelltyp-spezifische Interleukine. Schüttet nun eine Zelle einen zum Antikörper korrespondierendes Interleukin aus, wird dieses gebunden. Dieser Komplex aus Zelle, Antikörper und Interleukin kann in einem weiteren Schritt durch einen markierten Antikörper detektiert werden. Diese Methode bietet die neuartige Möglichkeit, die Zellen nach ihren ausgeschütteten Interleukinen zu sortieren, ohne die Zelle zu beschädigen.

Es wurden  $CD4^+$  T-Zellen ( $10^6$  Zellen/ml) in einer 48-Mikrotiterplatte mit plattengebundenen CD3 (1 g/ml) und löslichem Anti-CD28 (1 g/ml) in der Anwesenheit von IL-2 (10 units/ml) und für verschiedene Perioden mit oder ohne 31.25 ng/ml IL-4 aktiviert. Als Medium wurde RPMI Medium 1640 ergänzt mit Penicillin G (50 units/ml), 50 g/ml Streptomycin, 2 nM L-glutamine (all from Gibco/Invitrogen), 10 IU/ml rekombinantes humanes IL-2 (Proleukin; Chiron), und 10 % normales humanes Serum bei 37 °C in einer feuchteten Atmosphäre, die 5 %  $CO_2$  enthielt, verwendet. Um  $T_H17$ -Zellen zu induzieren, wurden naive  $CD4^+$  T-Zellen für 6 Tage mit Anti-CD3 und Anti-CD28 in der Anwesenheit oder Abwesenheit von IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), IL-21 (100 ng/ml), und/oder IL-23 (20 ng/ml) stimuliert und ruhten anschließend für 2,5 Tage bis zur Analyse und Sortierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Für die Zytokinfärbung wurden die Zellen über 5 h mit 1 mM Ionomycin und 20 ng/ml Phorbol myristate Acetat (PMA) restimuliert.

#### 2.2.4 Elektrophysiologische Techniken



**Abbildung 7 Elektrophysiologischer Set-Up.** A) Patch-Setup mit Mikroskop, interne und externe Elektrode, und Applikationsvorrichtung. B) Naïve  $CD4^+$  T-Zelle während der Patch-Clamp-Messung.

Alle elektrophysiologischen Messungen wurden im “tight-seal” Ganz-Zell “whole-cell” Patch-Clamp Modus bei Raumtemperatur durchgeführt. Die whole-cell Patch-Clamp-Daten wurden mit dem EPC10 Patch-Clamp-Verstärker und der PatchMaster v2x52 Software erfasst und aufgezeichnet. Die Patchpipetten waren aus Borosilikatglas (Science Products, Hofheim, Germany) und hatten einen Widerstand zwischen 2.0 und 4.5 mOhm, wenn sie mit der Standard  $Mg^{2+}$ -freien intrazellulären Lösung befüllt waren. Um TRPM7-Ströme zu maximieren, wurde eine  $Mg^{2+}$  und  $Mg\cdot ATP$  freie Lösung verwendet. [23, 54] Die Zellen wurden zur besseren Fixierung mindestens 30 min vor Ver-

suchsbeginn auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät. Alle verwendeten internen und externen Lösungen zeigten eine Osmolalität zwischen 280 und 320 Milliosmol (mosm). Der Unterschied zwischen interner und externer Lösung betrug maximal 20 mosm.

Die Ströme wurden durch ein Rampenprotokoll von -100 mV zu +100 mV über 50 ms ausgelöst, mit einem Haltepotential von 0 mV gemessen. Einwärtsgerichtete Stromamplituden wurden bei -80 mV extrahiert, Auswärtsströme bei +80 mV, normiert auf die Zellgröße und gegen die Zeit des Experiments aufgetragen. Die untersuchten T-Zellen zeigten eine durchschnittliche Kapazität zwischen 1,5 und 5 pF (Picofarad).

Die Identifikation des korrekten Stroms erfolgte durch Vergleich der Stromspannungskurven (IV-Curve) mit repräsentativen TRPM7-Strömen. TRPM7 leitet  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  bei negativem Membranpotential. Bei Potentialen über + 50 mV ist die Antriebskraft für zweiwertige Ionen, in die Zelle einzudringen gering und der Durchlässigkeitsblock durch zweiwertige Ionen wird reduziert. Es kommt zum Ausstrom von monovalenten Kationen. Diese Eigenschaften können zur Identifizierung von TRPM7 genutzt werden. Alle verwendeten Daten zeigten eine für TRPM7-typische Stromspannungskurve nach 300 s [23].

#### *Elektrophysiologische Messungen von TRPM7 in $\text{Mg}^{2+}$ -freier Lösung*

Zunächst erfolgte die Messung verschiedener T-Zellsubtypen, zur Maximierung der Leitfähigkeit von TRPM7, unter  $\text{Mg}^{2+}$ -freier, interner und externer Lösung (s. **Tabelle 11** und **Abbildung 8**) [22, 54, 114].

#### *Quantifizierung funktionaler TRPM7-Kanäle*

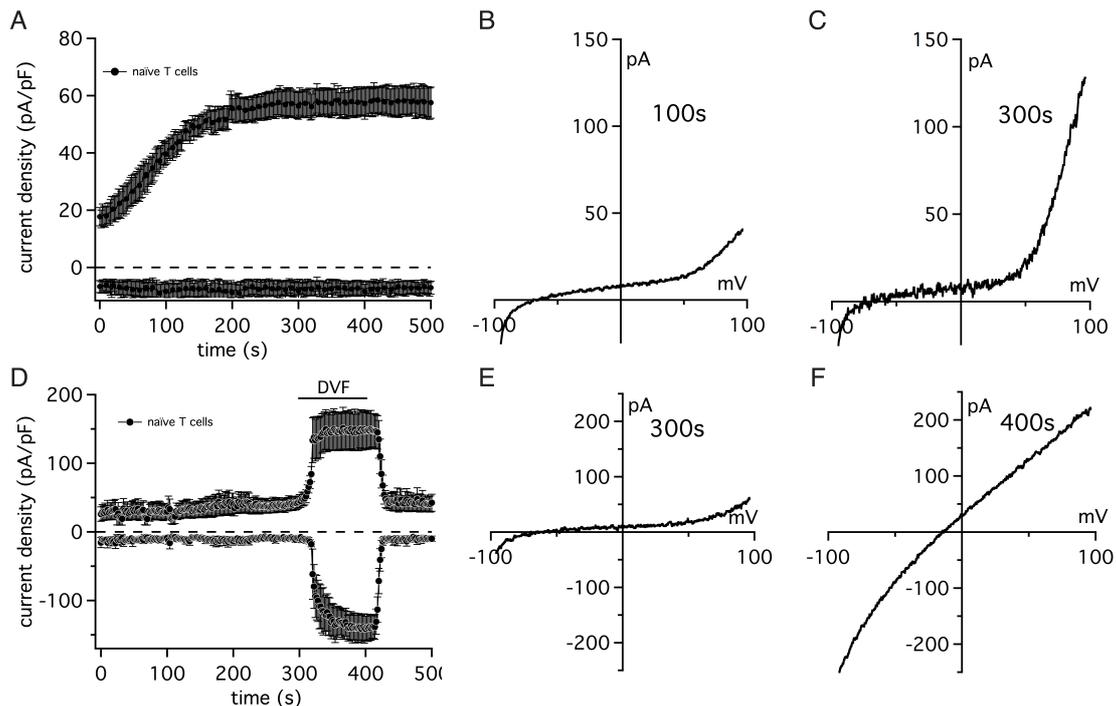
Die zweite Versuchsbedingung erfolgte zur genaueren Quantifizierung und zum Vergleich der Anzahl funktionsfähiger Kanäle in der Zellmembran der einzelnen Subtypen.

Es wurde eine externe Lösung mit physiologischer  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration (2 mM) und eine  $\text{Mg}^{2+}$ -freie intrazelluläre Lösung gewählt (s. Tabelle 9/11). Im Intervall erfolgte die Applikation von bivalentfreier Lösung (eng. divalent free – DVF). Die Applikation von DVF führt zum Wegfall des physiologischen Blocks des Kanals durch zweiwertige Kationen. Fehlt dieser Block, kommt es zu einem linearen Strom monovalenter Kationen durch den geöffneten Kanal. Da der Strom linear zur Anzahl der Kanäle ansteigt, lässt sich aus bekannten Stromwerten für TRPM7 aus Einzelkanalmessungen die Anzahl der

funktionsfähigen Kanäle pro Zelle abschätzen [8]. Aus den gewonnenen Daten über den abgeleiteten Strom ist bei bekannter Einzelkanalleitfähigkeit von 40 pS bei -80 mV eine Errechnung der funktionellen TRPM7-Kanäle möglich.

### Naïve CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die verwendeten naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden entsprechend oben genanntem Protokoll isoliert und elektrophysiologisch charakterisiert.



**Abbildung 8 Elektrophysiologische Charakterisierung von naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** Ganzzell-Patch-Clamp Analyse von TRPM7-Strömen in naïven humanen T-Zellen mit Mg<sup>2+</sup>-freier Pipettenlösung. **A-B)** Mg<sup>2+</sup>-freie externe Lösung. **A)** Mittelwerte der Stromzeitkurven mit Standardfehler (n = 7). **B)** Repräsentative Stromspannungskurve extrahiert bei 300 s. **C-E)** Externe Lösung mit 2 mM Mg<sup>2+</sup>. **C)** Mittlere Stromdichte aufgetragen über die Zeit ± Standardfehler. Applikation von bivalentfreier Lösung (DVF, engl.: divalent-free) ab 300 s bis 400 s (n=5). **D)** Stromspannungskurve (IV-Kurve) extrahiert bei 300s vor der Applikation von bivalentfreier Lösung, aus einem repräsentativen Experiment. **E)** Stromspannungskurve (IV-Kurve) extrahiert bei 400 s während der Applikation von bivalentfreier Lösung aus einem repräsentativen Experiment.

In der **Abbildung 8** sind Mittelwert und Standardabweichung der Stromzeitkurven von sieben naïven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gezeigt. In **Abbildung 8 A** gezeigte, einwärtsgerichtete Stromamplituden wurden bei -80 mV extrahiert, Auswärtsströme bei +80 mV, normiert auf die Zellgröße und gegen die Zeit des Experiments aufgetragen. Zu Beginn der Messung zeigte sich eine Stromamplitude von ca.  $18 \pm 3,2$  pA/pF bei einer mittleren

Zellkapazität von 1.24 pF. Diese wird hauptsächlich von kapazitiven K-Kanälen getragen. Nach ca 250 s zeigt sich ein konstanter, durchschnittlicher, positiver Auswärtsstrom mit  $56,4 \pm 4,7$  pA/pF, der Einwärtsstrom betrug  $-8,2 \pm 2,9$  pA/pF. Die **Abbildung 8 E** zeigt eine repräsentative Stromspannungskurve einer naïve CD4<sup>+</sup> T-Zelle nach 300 s unter oben genannten Versuchsbedingungen.

Die **Abbildung 8 D** zeigt die mittlere Stromdichte von 5 naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen über die Zeit von 500 s. Die Stromdichte nahm über die ersten 250 s zu. Nachdem die Stromdichte ein stabiles Niveau erreichte, erfolgte zwischen Sekunde 300 und 400 die gezielte Applikation von bivalentfreier Lösung. Zu Beginn der Messung lag die Stromdichte der naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Mittel bei  $26,0 \pm 10,6$  pA/pF. Kurz vor der Applikation bei 290 s wurde eine Stromdichte von  $39,5 \pm 8,5$  pA/pF gemessen. Während der gezielten Applikation von bivalentfreier Lösung zeigte sich eine Zunahme der Stromdichte auf  $147,3 \pm 28,7$  pA/pF, welche sich nach Ende der Applikation bei 450s wieder auf  $41,3 \pm 12,5$  pA/pF normalisierte.

**Abbildung 8 D-F** zeigt die repräsentativen Stromspannungskurven einer naïven CD4<sup>+</sup> T-Zelle vor und während der Applikation von bivalentfreier Lösung. **Abbildung 8 E** zeigt eine repräsentative Stromspannungskurve nach Erreichen der maximalen Stromamplitude bei 300 s, bei annähernd physiologischer externer Lösung mit 2 mM Mg<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>-freier interner Lösung. Die Stromspannungskurve zeigt den für TRPM7 typischen Verlauf. Versuche, die keine für TRPM7 typische Kurve zeigten, wurden nicht verwertet. In **F** ist die Stromspannungskurve während der Applikation von bivalentfreier Lösung bei 400 s gezeigt. Es kommt zu einem linearen Strom monovalenter Kationen, der eine erhöhte Stromamplitude zeigt.

### 2.2.5 Immunzytochemische Färbung von TRPM7

Die immunologische Färbung wurde durchgeführt, um zelluläre Strukturen in und an der Zelloberfläche mit spezifischen Antikörpern zu markieren. Die Zellen wurden zunächst auf mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät und nach einer Ruhezeit von 30 min bei 37 °C mit 2 % PFA (37 °C) in PBS fixiert. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei Raumtemperatur. Um überschüssiges PFA zu entfernen, wurden die Deckgläschen 3 mal mit PBS gewaschen. Danach folgte die Permeabilisierung der Zellen, um den Antikörpern Zugang zu allen Bereichen der Zelle zu gewähren. Triton

X-100 (0,2 % in PBS) wurde dafür 5 min bei Raumtemperatur verwendet. Als ein organisches Lösungsmittel löst es Lipide aus der Zellmembran und macht sie damit durchlässig für Antikörper. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde FcR-Blockierungs-Reagenz verwendet. Die Blockierung erfolgte in einer Kammer mit erhöhter Luftfeuchtigkeit mit 50  $\mu$ l FcR-Blockierungs-Reagenz (1.2  $\mu$ l Reagenz pro 50  $\mu$ l PBS). Inkubiert wurde für 30 min bei 37 °C und danach mit 0,5 ml PBS gewaschen.

Für einen zweiten Blockierungsschritt wurde normales Ziegen Serum verwendet. Eine Lösung aus 0,5  $\mu$ l normalem Ziegen Serum pro 0,5 ml BSA (2 % in PBS) wurde hergestellt und 0,5 ml pro Deckgläschen appliziert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit dem ersten Antikörper (rabbit $\alpha$ TRPM7, Alomone #ACC-047) für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Negativkontrolle war 0,5  $\mu$ l normales Ziegen Serum (NGS) in 500  $\mu$ l 2 % BSA, wie bereits bei der Blockierung verwendet.

Nach der vorgeschriebenen Inkubationszeit wurden die Deckgläschen drei mal mit PBS gewaschen, wobei zur besseren Lösung der überschüssigen Antikörper jeweils eine Inkubation von 5 min eingehalten wurde.

In einem verdunkelten Raum wurden 50  $\mu$ l des zweiten Antikörpers (Alexa Flour goat $\alpha$ rabbit, 488 nm, 1:1200 in PBS) verwendet. Nach weiteren 40 min Inkubation und anschließendem Waschschrift wurden die Deckgläschen mit mounting medium (deut. Eindeckmedium) auf Objektträger fixiert. Die Erstellung der Bilder erfolgte mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss, LSM 510) im Einzelbildmodus.

#### 2.2.6 Differenzierung von speziellen T-Lymphozyten-Subtypen

Als Standard-Kontrollbedingung verwendete ich die Differenzierung von CD24<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>/FoxP3<sup>-</sup> isolierten T Zellen zu CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen. Dafür wurden die Zellen für 5 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Kulturmedium bestand aus NHS/RPMI mit IL-2 (50 U/ml), Anti- $\alpha$ CD3/28 Beads (1:4 zu Zellen), TGF-beta (5 ng/ml), Retinoic acid (100 nM/ml).

Um das Gesamtüberleben zu verbessern, wurden das Medium und alle Zusätze alle 48 h gewechselt.

### *Differenzierungsexperimente mit Variation des extrazellulären Magnesiums*

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, hat Magnesium einen modulierenden Effekt auf TRPM7. Um den Einfluss von  $Mg^{2+}$  und damit indirekt den Einfluss von TRPM7 auf die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen zu untersuchen, wurde die Differenzierung mit unterschiedlichen Konzentrationen von  $Mg^{2+}$  durchgeführt.

Dabei wurde das Standardprotokoll mit  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen zwischen 0 mM  $Mg^{2+}$  und 10 mM  $Mg^{2+}$  verwendet und die Zellen über 7 Tage inkubiert. Als Kontrolle wurde unser Standardprotokoll bei physiologischer  $Mg^{2+}$ -Konzentration verwendet.

Zur Analyse der unterschiedlichen Differenzierungsraten wurde eine intrazelluläre FoxP3-Färbung verwendet, um den prozentualen Anteil der differenzierten  $T_{reg}$ -Zellen zu ermitteln.

### *Differenzierungsexperimente mit TRPM7-Inhibitoren*

Um den direkten Einfluss von TRPM7 auf die Differenzierung von  $T_{reg}$ -Zellen zu beobachten, wurde TRPM7 während des Standardprotokolls zur  $T_{reg}$ -Differenzierung durch verschiedene Substanzen blockiert. Zur Blockierung wurden Waixenicin A und NS8593 in Konzentrationen zwischen 6  $\mu$ M und 30  $\mu$ M verwendet. Um eine ideale Kontrolle zu haben, wurde neben der Standardkontrolle eine weitere Kontrolle mit der Konzentration der Blocklösungen entsprechender DMSO-Lösung verwendet. Um Effekte von NS8593 auf Calcium-aktivierte Kaliumkanäle mit kleiner Leitfähigkeit (SK- Small-Conductance-Kalium-Kanäle) ausschließen zu können, wurde zusätzlich ein bekannter SK-Kanal-Blocker Apamin (100 nM) verwendet.

Das Gesamtüberleben konnte durch den Austausch des Mediums und all seiner Zusätzen alle 48 h verbessert werden.

### *Rettungsexperimente*

Es wurden weiterhin eine Reihe von Rettungsexperimenten durchgeführt. Dafür wurden zwei verschiedene Bedingungen zur Differenzierung von  $T_{reg}$ -Zellen mit der Kontrolle unter Standardbedingungen verglichen: Erstens eine erhöhte  $Mg^{2+}$ -Konzentration (6 mM) des Kulturmediums und zweitens eine gleichzeitig erhöhte  $Mg^{2+}$ -Konzentration (6 mM) im Kulturmedium unter Zugabe von TRPM7-Blocker Waixenicin A (30  $\mu$ M). Alle Proben wurden entsprechend den Standardbedingungen inkubiert. Das Gesamtüberleben wurde durch den Wechsel des Mediums mit allen Zusätzen alle 48 h verbessert.

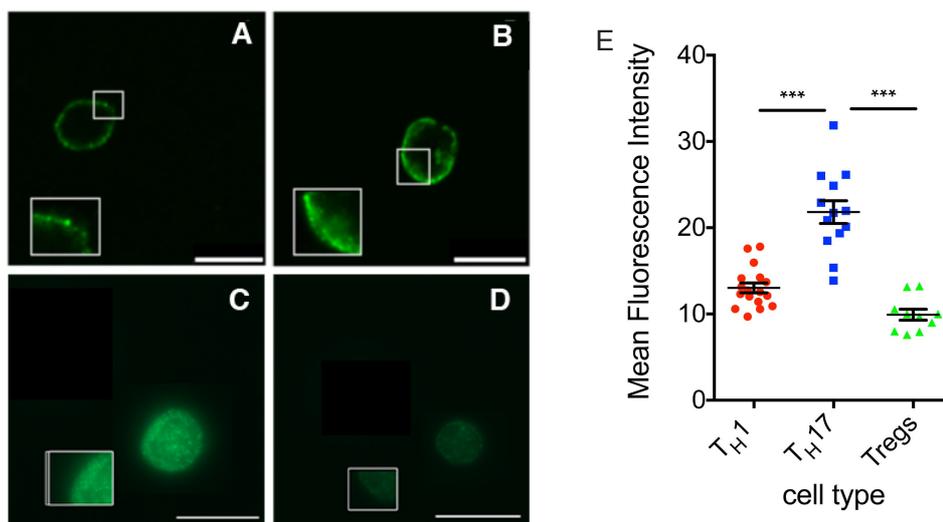
## 2.3 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der IGOR PRO und Microsoft Excel Software durchgeführt. Der Standardfehler von zwei unabhängigen Proben wurde mit Hilfe eines ungepaarten, zweiseitigen Studentischen-T-Test bzw. von mehreren Proben mittels zweiseitigen ANOVA bestimmt. Ein P-Wert von 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen und markiert als: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  bzw. „n.s.“ als nicht signifikant.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 TRPM7-Expression in verschiedenen T-Lymphozyten Subtypen

Um einen ersten Eindruck über die TRPM7-Expression in verschiedenen T-Lymphozytengruppen zu erhalten, wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Dafür wurden in Kooperation mit Prof. Schulze-Koops direkt aus Vollblut gewonnene naive  $CD4^+$  T-Zellen *in vitro* in unterschiedliche T-Zellsubtypen ( $T_H1$ - und  $T_H17$ -Zellen) differenziert. Die Zellen wurden per Capture-Assay sortiert (s. 2.2.3) und uns zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 9 Immunzytochemische Darstellung der TRPM7-Expression in verschiedenen T-Zell Subtypen.** Laser-Scanning-Mikroskopische (LSM) Aufnahmen einer Immunfärbung von *in vitro* differenzierten humanen T-Lymphozyten gefärbt mit rabbit-anti-TRPM7 Antikörper, Alomone #ACC-047 auf TRPM7. A) Representative Abbildung eines naiven  $CD4^+CD25^-$ -T-Lymphozyten. B) Representative Abbildung eines  $CD4^+IFN-\gamma^+$   $T_H1$ -Lymphozyten. C) Representative Abbildung eines  $CD4^+IL-17^+$   $T_H17$ -Lymphozyten. D) Representative Abbildung eines  $CD4^+CD25^+$  natürlichen regulatorischen T-Lymphozyten ( $nT_{reg}$ ). (E) Quantitative Analyse der Fluoreszenzintensität mittels ImageJ Software. Mittelwert der Fluoreszenzintensität von  $T_H1$ -Zellen (rot,  $n = 14$ ),  $T_H17$ -Zellen (blau,  $n = 12$ ), sowie  $nT_{reg}$ s (grün,  $n = 11$ ). Statistik: ANOVA \*\*\* =  $P < 0.0001$ .

Wie in **Abbildung 9** deutlich wird, konnte in den immunzytochemisch mit Fluoreszenzantikörpern markierten TRPM7 gefärbten  $CD4^+$  T-Lymphozyten ein unterschiedliches Maß an Fluoreszenzintensität detektiert werden. Die geringste Fluoreszenzintensität wiesen die naiven und natürlichen regulatorischen  $CD4^+$  T-Zellen auf. Eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität wurde in den *in vitro* differenzierten  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Zellen gemessen (**Abbildung 9 B-D**). Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe der ImageJ Software.

## 3.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der TRPM7-Kanalaktivität in verschiedenen T-Zellsubtypen

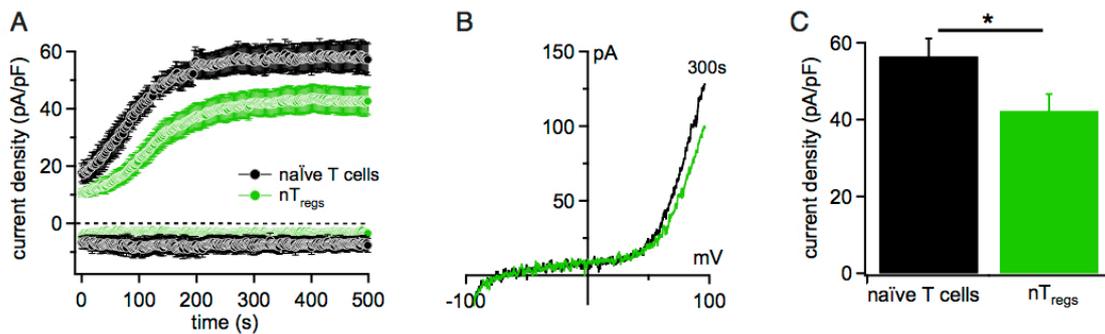
Natürliche regulatorische T-Lymphozyten ( $nT_{regs}$ ) entstehen wie naive  $CD4^+$  T-Zellen bereits im Thymus. Beide Zelltypen ähneln sich nicht nur in ihrer Zellgröße, sondern auch in ihrem aktivierungsbereiten Zustand. Während sich die naiven  $CD4^+$  T-Zellen durch externe Reize zu proinflammatorischen T-Lymphozyten entwickeln können, haben die  $nT_{regs}$  die Funktion, die Aktivierung des Immunsystems in gewisser Weise zu unterdrücken. Aufgrund ihrer ähnlichen Entwicklung und dennoch unterschiedlichen Aufgaben wurde ein direkter Vergleich dieser Zellen angestrebt. Neben dem Proteinexpressions-Nachweis mittels Antikörper ist insbesondere die Funktionalität des Proteins an der Membran für die Zelle entscheidend, weshalb eine Analyse mittels Elektrophysiologie angestrebt wurde.

### 3.2.1 TRPM7-Kanalaktivität

TRPM7 ist ein ubiquitär exprimiertes Kanalprotein, daher wird erst durch eine unterschiedlich starke Expression ein möglicher physiologischer Unterschied deutlich. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden  $nT_{regs}$  mit Zellen ähnlicher Herkunft und Reifung verglichen. Als Vergleich wurden daher naive  $CD4^+$  T-Zellen gewählt. Beide Zelltypen entwickelten sich *in vivo* im Thymus und zeigten eine ähnliche Zellgröße / Kapazität (vgl. **Tabelle 17**).

#### *Vergleich der TRPM7-Kanalaktivität naiver $CD4^+$ T-Zellen und $T_{reg}$ -Zellen*

Die TRPM7-Aktivität wurde als mittlere Stromdichte über die Zeit dargestellt.



**Abbildung 10 Elektrophysiologische Charakterisierung der Aktivität des TRPM7 Kanals in T-Zellen.** Vergleich der TRPM7-Kanalaktivität direkt isolierter naïver  $CD4^+$  T-Zellen (schwarz,  $n=7$ ) und natürlichen  $T_{reg}$ -Zellen ( $nT_{regs}$ , grün,  $n=12$ ) mittels Ganzzell-Patch-Clamp Analyse. Gemessen wurde mit  $Mg^{2+}$ -freier Pipettenlösung und nominal  $Mg^{2+}$ -freier externer Lösung um TRPM7 Ströme zu maximieren. **A)** Vergleich der Mittelwerte der Stromdichte über die Zeit  $\pm$  Standardfehler. **B)** Stromspannungskurve (IV-Kurve) bei 300s aus je einem repräsentativen Experiment. **C)** Vgl. der mittleren Stromdichte bei 300 s  $\pm$  Standardfehler, \*  $p < 0,05$ , Studentischer T-Test.

Im Vergleich zeigten die  $nT_{regs}$  gegenüber den naïven  $CD4^+$  T-Zellen eine über die ganze Messung erniedrigte Stromdichte (vgl. **Abbildung 10** und **Tabelle 17**). Nach Erreichen eines stabilen Auswärtsstroms bei 300 s zeigten die  $nT_{regs}$  mit  $42,2 \pm 4,4$  pA/pF eine signifikant kleinere mittlere Stromdichte als die naïven  $CD4^+$  T-Zellen mit  $56,4 \pm 4,7$  pA/pF (vgl. **Abbildung 10**).

|                                | naïve T-Zellen | nTreg           |
|--------------------------------|----------------|-----------------|
| Anzahl (n)                     | 7              | 12              |
| Kapazität (pF)                 | $1,24 \pm 0,2$ | $1,46 \pm 0,5$  |
| Stromdichte (pA/pF) nach 0 s   | $2,6 \pm 0,11$ | $1,41 \pm 0,1$  |
| Stromdichte (pA/pF) nach 100 s | $39,6 \pm 3,6$ | $23,00 \pm 3,6$ |
| Stromdichte (pA/pF) nach 300 s | $56,4 \pm 4,7$ | $42,2 \pm 4,4$  |

**Tabelle 17: Tabellarische Gegenüberstellung von naïven  $CD4^+$  T-Zellen und  $nT_{regs}$ .** Vergleich elektrophysiologischer Parameter von  $nT_{regs}$  mit naïven  $CD4^+$  T-Zellen mittels Ganzzell-Patch-Clamp Analyse von Strömen ausgelöst durch 0 mM  $Mg^{2+}$  Pipettenlösung und nominal  $Mg^{2+}$ -freier externer Lösung. Die Kapazität entspricht dem Mittelwert aller gemessenen Einzelmesspunkte  $\pm$  dem Standardfehler. Alle angegebenen Stromdichten entsprechen dem Mittelwert zum angegebenen Zeitpunkt  $\pm$  Standardfehler.

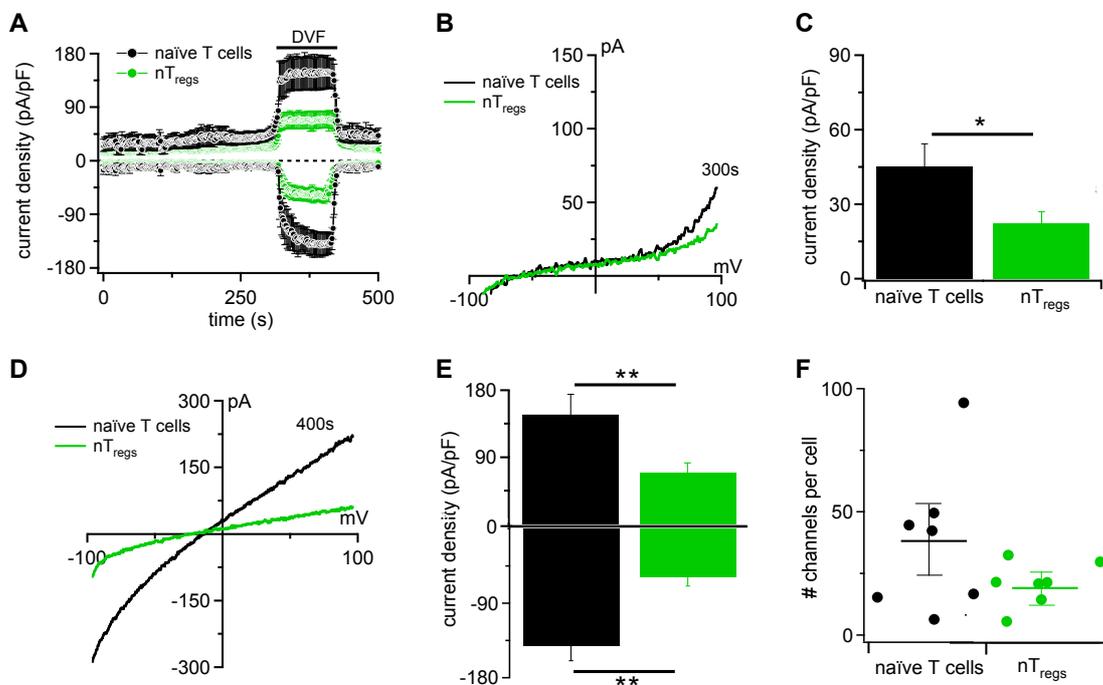
Die TRPM7-Aktivität unter nominal  $Mg^{2+}$ -freier externer und  $Mg^{2+}$ -freier interner Lösung zeigt damit Unterschiede zwischen  $nT_{regs}$  und naïven  $CD4^+$  T-Zellen.

### Vergleich der Anzahl funktionsfähiger TRPM-Kanäle in naiven $CD4^+$ T-Zellen und $T_{reg}$ -Zellen

Dieser Ansatz wurde verwendet, um zu beantworten, ob sich die funktionelle Expression von TRPM7 in den unterschiedlichen T-Helfer-Subtypen unterscheidet.

Für die Bestimmung wurden die Zellen auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät und unsere Standard-extrazelluläre-Ringerlösung mit  $2\text{ mM Mg}^{2+}$  verwendet sowie als intrazelluläre Lösung eine  $Mg^{2+}$ -freie Lösung. Nach 300 s wurde über einen Zeitraum von 100 s eine bivalent freie Lösung appliziert und danach die Messung für weitere 100 s fortgesetzt.

Um einen vollständigen Eindruck von der TRPM7-Expression der verschiedenen Zellpopulationen zu bekommen, wurde neben der Stromdichte auch die Anzahl der TRPM7-Kanäle pro Zelle berechnet. Dafür wurden die bei  $-80\text{ mV}$  gemessenen mittleren negativen Einwärtsströme während der Applikation von bivalentfreier Lösung bestimmt. Anhand bekannter Einzelkanalmessungen für TRPM7 [8] unter gleichen Bedingungen konnten daraus die Kanäle pro Zelle berechnet werden (vgl. Methodenteil 2.2.4).



**Abbildung 11 Elektrophysiologische Quantifizierung der TRPM7 Kanal-Expression.** Ganzzell-Patch-Clamp Vergleich  $nT_{reg}$ -Zellen (grün,  $n=6$ ) und naive  $CD4^+$  T-Zellen (schwarz,  $n=5$ ),  $0\text{ mM Mg}^{2+}$  Pipettenlösung, externe Lösung mit  $2\text{ mM Mg}^{2+}$ . A) Stromspannungskurve über 500 s mit Applikation von

bivalentfreier Lösung (engl.: divalent-free, DVF) **B**) Stromspannungskurven bei 300s nach Entwicklung des maximalen TRPM7-Stroms aus einem repräsentativen Experiment; **C**) Vergleich der mittleren Stromdichte bei 300 s **D**) Stromspannungskurven bei 400 s während der Applikation von bivalentfreier Lösung aus einem repräsentativen Experiment; **E**) Vergleich der mittleren Stromdichte bei 400 s **F**) Vergleich funktionsfähiger, membranständiger Kanäle pro Zelle. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , Studentischer T-Test.

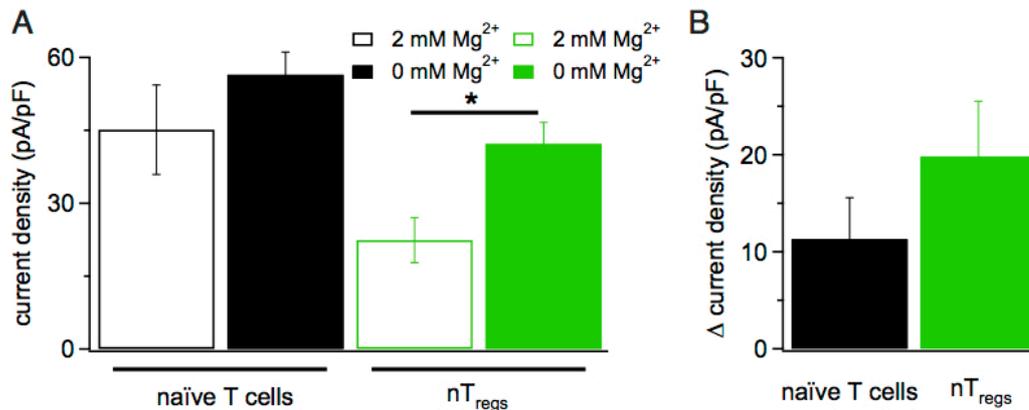
**Abbildung 11 A** zeigt die Stromspannungskurve bei 400 s während der Applikation von bivalentfreier Lösung für beide Zellpopulationen. Es lässt sich eine Linearisierung der Ströme unter Wegfall von bivalenten Ionen erkennen. Außerdem erkennt man bereits vor der Normalisierung auf die Zellgröße einen Unterschied in der Amplitude des TRPM7 Stroms. Dieser Eindruck bestätigt sich beim Vergleich der Stromdichte nach 400 s. Die Stromdichte des Einwärts- als auch des Auswärtsstroms von TRPM7 zeigt sich nach 400 s bei den  $nT_{reg}$ -Zellen hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) kleiner als die Stromdichte der naiven  $CD4^+$  T-Zellen.

Aus dem Einwärtsstrom während der Applikation von bivalentfreier Lösung lässt sich für jede Zelle die Anzahl der an der Oberfläche exprimierten TRPM7-Kanäle bestimmen. Dies ist in **Abbildung 11 C** dargestellt. Die  $nT_{reg}$ -Zellen exprimieren im Mittel  $21,2 \pm 4,07$  TRPM7-Kanäle an ihrer Oberfläche, die naiven  $CD4^+$  T-Zellen  $42,3 \pm 15,3$  TRPM7-Kanäle.

Damit zeigt sich ein Unterschied in der Anzahl der funktionsfähigen TRPM7 Kanäle, die in naiven  $CD4^+$  T-Zellen und  $T_{reg}$ -Zellen exprimiert sind.

### 3.2.2 Effekt von extrazellulärem $Mg^{2+}$

Durch eine Reduzierung des extern zur Verfügung stehenden  $Mg^{2+}$  kommt es wie erwartet zu einer Erhöhung der Stromdichte von TRPM7 (s. **Abbildung 12**).



**Abbildung 12 Regulation der TRPM7 Stromdichte durch extrazelluläres Mg<sup>2+</sup>.** Ganzzell-Patch-Clamp Vergleich der Stromdichte von TRPM7 bei verschiedenen extrazellulären Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen in nT<sub>reg</sub>-Zellen (grün, n=6) und naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen (schwarz, n=5). 0 mM Mg<sup>2+</sup> Pipettenlösung. **A)** externe Lösung mit 2 mM Mg<sup>2+</sup> oder nominal Mg<sup>2+</sup>-frei. **B)** Delta der Stromdichte bei 2 mM Mg<sup>2+</sup> und nominal Mg<sup>2+</sup>-freier Lösung. p < 0.05.

Ein Vergleich der Stromdichten von TRPM7 in naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen und nT<sub>regs</sub> bei externer Lösung mit und ohne Mg<sup>2+</sup> bei 300s zeigt eine unterschiedliche Reaktion der T-Zellsubtypen auf Mg<sup>2+</sup>. Die naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigen bei 300 s mit 2 mM Mg<sup>2+</sup> eine Stromdichte von 45,1 ± 9,2 pA/pF und ohne Mg<sup>2+</sup> eine Stromdichte von 56,4 ± 4,7 pA/pF, womit sich eine Änderung der Stromdichte von 11,3 ± 4,2 pA/pF ergibt. Die nT<sub>reg</sub> zeigen bereits bei 300 s mit 2 mM Mg<sup>2+</sup> eine geringere Stromdichte mit 22,4 ± 4,6 pA/pF und ohne Mg<sup>2+</sup> eine Stromdichte von 42,2 ± 4,4 pA/pF, womit sich eine Änderung der Stromdichte von 19,8 ± 5,7 pA/pF ergibt.

Vergleicht man diese Ergebnisse, wird die TRPM7-Stromdichte von nT<sub>regs</sub> stärker durch das zur Verfügung stehende Mg<sup>2+</sup> beeinflusst, als die der naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

### 3.3 Einfluss von TRPM7 und Mg<sup>2+</sup> auf die Differenzierung von induzierten T<sub>reg</sub>-Lymphozyten (iT<sub>regs</sub>)

Neben den natürlichen T<sub>reg</sub>-Zellen spielen im Immunsystem induzierte T<sub>reg</sub>-Zellen beim immunologischen Gleichgewicht eine entscheidene Rolle. Diese Zellen werden nicht wie nT<sub>reg</sub>-Zellen im Thymus gebildet, sondern entstehen durch Differenzierung von naïven T-Lymphozyten in der Peripherie.

Aufgrund der beobachteten Unterschiede in der TRPM7-Kanalexpression zwischen naiven  $CD4^+$  T-Zellen und  $nT_{regs}$ , stellt sich die Frage, welche Rolle TRPM7 bei der Differenzierung von induzierten  $T_{reg}$ -Zellen ( $iT_{reg}$ ) spielt. Da es sich bei TRPM7 um einen  $Mg^{2+}$ -Kanal handelt, war darüberhinaus interessant, welchen Einfluss  $Mg^{2+}$  auf die Differenzierung von  $iT_{reg}$ -Zellen hat.

Für die Differenzierungsversuche wurden  $CD4^+ CD25^-$  T-Helferzellen verwendet, die im Folgenden als konventionelle T-Zellen bezeichnet werden. Die Population entsprach einer Mischpopulation verschiedener T-Helferzellen ohne bereits natürliche  $T_{regs}$  zu enthalten.

Die Isolation der für die Differenzierungsversuche verwendeten konventionellen T-Zellen erfolgte durch einen mehrstufigen Prozess aus getestetem Probandenblut, freundlicherweise durch unseren Kooperationspartner zur Verfügung gestellt (s. Methodenteil 2.1.2)

### 3.3.1 *In vitro* Differenzierung von $iT_{regs}$

Das beschriebene Prozedere bezieht sich auf die für alle Versuche verwendete Standardkontrolle. Es wurden zunächst  $CD25^-$  Zellen isoliert (s. Methodenteil 2.2.6).

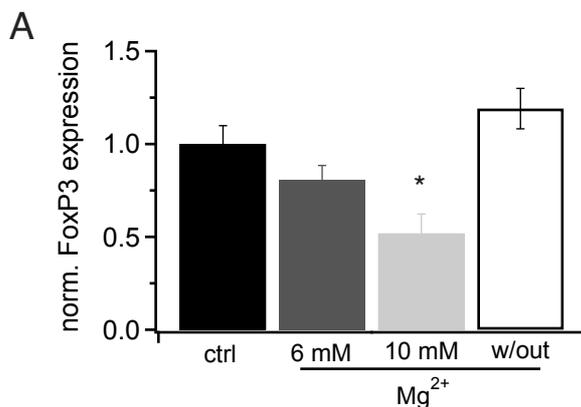
Nach der Isolation erfolgte eine 3-7 tägige Differenzierung der Zellen mit Retinsäure, TGF-beta (Transforming growth factor beta), Antikörpern gegen CD3 und CD28 ( $\alpha CD3/\alpha CD28$ ) sowie IL-2. Die Länge der Differenzierung wurde den entsprechenden Experimenten angepasst. Wurde beim Experiment das Medium zwischenzeitlich gewechselt, so erfolgte dies auch in der Kontrollprobe.

### 3.3.2 Negativer Effekt von Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) auf die *in vitro* Differenzierung von $iT_{regs}$

Es konnte immer wieder gezeigt werden, dass  $Mg^{2+}$  eine wichtige Rolle im Immunsystem spielt [63, 104, 105, 106]. Es stellt sich deshalb die Frage, ob die extrazelluläre  $Mg^{2+}$ -Konzentration auch einen Einfluss auf die Differenzierung von T-Helferzellen hat. Da wir zeigen konnten, dass die Kanalaktivität und Expression des  $Mg^{2+}$ -leitenden TRPM7-Kanals in  $nT_{regs}$  stark reduziert ist (**Abbildung 11**), haben wir, hier im Speziel-

len, den Einfluss von  $Mg^{2+}$  auf die Differenzierung von induzierten regulatorischen T-Helferzellen ( $iT_{regs}$ ) untersucht. Hierfür wurden konventionelle T-Helferzellen unter Bedingungen mit verschiedenen Konzentrationen von  $Mg^{2+}$  im Medium in  $iT_{reg}$  Zellen differenziert und die Differenzierungsraten von  $iT_{regs}$  verglichen.

Die Experimente unterschieden sich von den Kontrollbedingungen nur durch den  $Mg^{2+}$  Gehalt im Medium. Es wurden Medien mit 6 mM  $Mg^{2+}$ , 10 mM  $Mg^{2+}$  und ohne  $Mg^{2+}$  mit normalem Humanen Serum (0,7-1,05 mM  $Mg^{2+}$ ), welches als Kontrollbedingung verwendet wurde, verglichen (vgl. **Abbildung 13**).



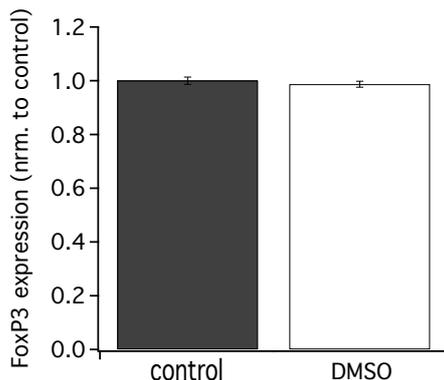
**Abbildung 13 Effekt verschiedener  $Mg^{2+}$ -Konzentration auf die Differenzierung von  $iT_{regs}$ .** FACS-Analyse nach 3 Tagen Differenzierung mit TGF-beta und IL-2 mit Hilfe eines intrazellulären Anti-FOXP3 Antikörpers. Ergebnisse wurden auf die Kontrolle normiert. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Die Kontrolle (ctrl; n = 12) unterschied sich signifikant von 10 mM  $Mg^{2+}$ , (n = 9). Anova-Test \* $p < 0,05$ .

Die durchgeführte Differenzierung mit erhöhtem  $Mg^{2+}$ -Gehalt im Medium zeigte signifikant niedrigere  $iT_{reg}$ -Differenzierungsraten als die Kontrollbedingung (**Abbildung 13**). Bei Verwendung von Medium mit 6 mM  $Mg^{2+}$ -Konzentration wurden durchschnittlich  $19,4 \pm 7,8$  % weniger Zellen zu  $iT_{regs}$  differenziert. Bei 10 mM  $Mg^{2+}$ -Konzentration im Medium entstanden  $48,2 \pm 10,4$ % weniger  $iT_{regs}$ . Dies ist signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Wurde  $Mg^{2+}$ -freies Medium verwendet, zeigte sich mit einer um  $19,1 \pm 10,9$  % gesteigerten  $iT_{reg}$ -Differenzierungsrate gegenüber der Kontrollprobe ein gegenteiliger Effekt.

### 3.3.3 TRPM7-Blockade verstärkt die iT<sub>reg</sub>-Differenzierung

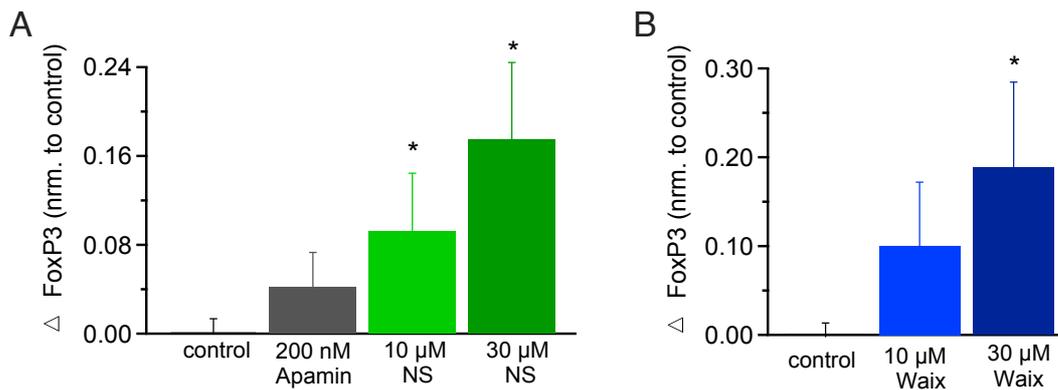
Nachdem die oben gezeigten Experimente den Einfluss von Mg<sup>2+</sup> auf die Differenzierung von iTregs zeigen konnten, war es von Interesse, welche Rolle der Mg<sup>2+</sup>-leitende Kanal TRPM7 in diesem Prozess spielen könnte. Um die Wirkung von TRPM7 auf die Differenzierung von iT<sub>regs</sub> zu zeigen, wurden die beiden TRPM7-Inhibitoren NS8593 und Waixenicin A verwendet [49, 115, 116]. Beide Inhibitoren zeigen verschiedene Wirkmechanismen, wobei bislang für Waixenicin A keine off-target Effekte nachgewiesen werden konnten.

Um unspezifische Effekte durch die Inhibition von sogenannten small-conductance-Kaliumkanälen (SK-Kanälen) durch NS8593 auszuschließen, wurde Apamin, welches nur SK-Kanäle, aber nicht TRPM7 inhibiert [115], als Kontrolle verwendet. Zusätzlich wurde eine DMSO-Kontrolle durchgeführt, um Auswirkungen des NS8593-Lösungsmittels auszuschließen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsansätzen.



**Abbildung 14 Einfluss DMSO auf die Differenzierung von iTregs.** Inkubation über 7 Tage mit TGF-beta, Anti- $\alpha$ CD3/28, Retinsäure und IL-2 mit (n=8) oder ohne 0.1% DMSO (n=8); alle 2 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Quantitative Analyse mittels FOXP3-Antikörper-Färbung und FACS-Analyse. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsansätzen.

Die Inhibitoren wurden in verschiedenen Konzentrationen der Differenzierungsbedingung (s. Methodenteil 2.2.6) hinzugegeben und über 7 Tage inkubiert. Um Effekten durch Verstoffwechslung der Inhibitoren entgegenzuwirken, wurde das Medium mit allen Zusätzen jeden zweiten Tag gewechselt.



**Abbildung 15 Einfluss der Blockade von TRPM7 auf die Differenzierung von  $iT_{reg}$ .** Inkubation von CD25<sup>+</sup>-T-Zellen über 7 Tage mit TGF-beta, Anti- $\alpha$ CD3/28, Retinsäure und IL-2, Mediumwechsel alle 2 Tage. Quantitative Auswertung mittels FOXP3-Antikörper-Färbung und FACS-Analyse. Delta FoxP3 normalisiert zur Kontrollbedingung. A)  $iT_{reg}$  Differenzierung unter Kontrollbedingungen (n=14) verglichen mit der Zugabe von TRPM7-Inhibitoren NS8593 (Endkonzentrationen von 10  $\mu$ M (n=8) und 30  $\mu$ M (n=8)). B)  $iT_{reg}$  Differenzierung unter Kontrollbedingungen (n=14) verglichen mit der Zugabe von Waixenicin A (Endkonzentrationen von 10  $\mu$ M (n=11) und 30  $\mu$ M (n=5)) Signifikanzen angegeben zur Kontrollbedingung Anova-Test \*p<0,05 \*\*p<0,01.

Es wurden Ansätze mit einer Endkonzentration von 6  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M Waixenicin A über 7 Tage inkubiert und mit den Kontrollbedingungen verglichen. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung der Differenzierungsrate von  $iT_{reg}$  gegenüber den Kontrollbedingungen, vgl. **Abbildung 15 B**.

Ein gleichgerichteter Effekt ließ sich auch durch die Verwendung des TRPM7-Inhibitors NS8593 zeigen, vgl. **Abbildung 15 A**. Es wurden Versuchsansätze mit einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M NS8593 über 7 Tage inkubiert und mit den Kontrollbedingungen verglichen.

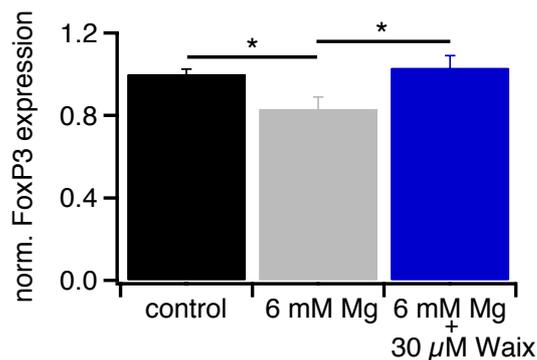
Die Differenzierungsversuche mit 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M NS8593 sowie die mit 30  $\mu$ M Waixenicin A zeigten einen signifikanten Anstieg des Prozentsatzes der  $iT_{reg}$ -Population nach Differenzierung.

Beide Inhibitoren des  $Mg^{2+}$ -Kanals TRPM7 führten trotz unterschiedlicher Wirkmechanismen zu einer Steigerung der  $iT_{reg}$ -Differenzierung. Dies lässt vermuten, dass tatsächlich die Aktivität des TRPM7-Ionenkanals der  $iT_{reg}$ -Differenzierung entgegenwirkt.

### 3.3.4 Rettung des negativen Effekts von $Mg^{2+}$ auf die Differenzierung von $iT_{regs}$

In den vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass 6 mM  $Mg^{2+}$  einen negativen Effekt auf die Differenzierung der  $iT_{regs}$  haben.

Es stellt sich die Frage, ob das erhöhte  $Mg^{2+}$ -Angebot im Medium durch die Blockierung des  $Mg^{2+}$ -leitenden Kanals TRPM7 kompensiert werden kann. Dafür wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem zusätzlich zum Kulturmedium mit 6 mM  $Mg^{2+}$  der TRPM7-Inhibitor Waixenicin A hinzugegeben wurde, der im vorangegangenen Versuch bei einer Konzentration von 30  $\mu$ M die Zahl der FoxP3 positiven Zellen signifikant erhöht hatte.



**Abbildung 16 Effekt von erhöhtem  $Mg^{2+}$  und gleichzeitiger TRPM7-Blockade (Rettungs-experiment)** - Inkubation von CD25<sup>-</sup>-T-Zellen mit TGF-beta, Anti- $\alpha$ CD3/28, Retinsäure und IL-2 für 3 Tage. Quantitative Analyse mittels FOXP3-Antikörper-Färbung und FACS-Analyse. Kontrollbedingungen entsprechend 1,2-1,8 mM  $Mg^{2+}$  (n=20) verglichen mit Kulturmedium mit 6 mM  $Mg^{2+}$  (n=20) und Kulturmedium mit 6 mM  $Mg^{2+}$  und Zusatz von 30  $\mu$ M Waixenicin A (n=12). Signifikanz bezogen auf die Kontrolle, Anova-Test \*p<0,05.

Wie bereits in **Abbildung 13** gezeigt, kommt es bei erhöhter  $Mg^{2+}$ -Konzentration im Medium zu einer geringeren Differenzierung von  $iT_{regs}$ . Bei gleichzeitiger Inhibition von TRPM7 durch 30 $\mu$ M Waixenicin A entsprach die  $iT_{reg}$  Population mit einer geringen Abweichung der Kontrollbedingung, vgl. **Abbildung 16**.

Dieses Experiment legt eine mögliche Kompensation des erhöhten  $Mg^{2+}$  Angebots durch gleichzeitige Hemmung des  $Mg^{2+}$  Kanals TRPM7 nahe und deutet weiter darauf hin, dass eine TRPM7-Blockade die Differenzierung in immunsupprimierende  $iT_{reg}$  Zellen fördert.

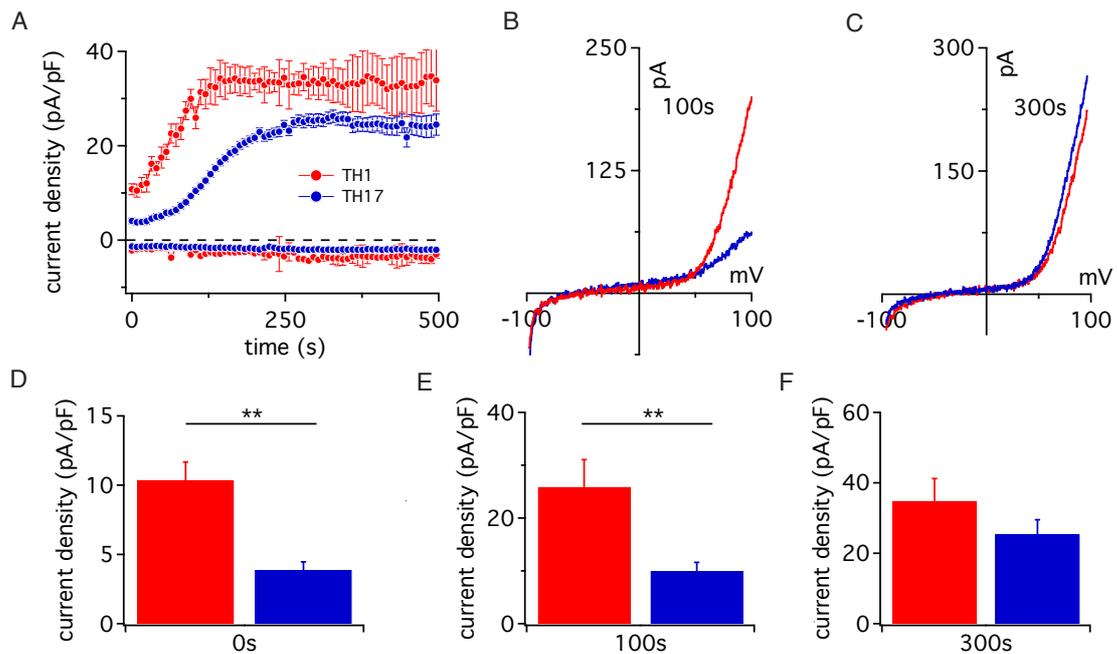
### 3.4 TRPM7 Aktivität in proinflammatorischen $CD4^+$ T-Effektorzellen

Nachdem die durchgeführten Experimente einen Hinweis darauf liefern, dass TRPM7 einen Einfluss auf die Differenzierung regulatorischer T-Helferzellen hat, stellt sich die Frage, ob TRPM7 auch bei proinflammatorischen T-Helferzellen eine Rolle spielt. Es wurden daher neben naiven  $CD4^+$  T-Zellen und  $nT_{reg}$ -Zellen auch *in vitro* differenzierte  $T_H1$ - und  $T_H17$ - Effektorzellen gesunder Probanden untersucht.

#### 3.4.1 Elektrophysiologischer Vergleich *in vitro* differenzierter $T_H1$ - und $T_H17$ -Effektorzellen

Die verwendeten  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Zellen wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners Prof. Dr. med. Schulze-Koops zur Verfügung gestellt. Es wurden zunächst naive  $CD4^+$  T-Zellen aus humanem Vollblut isoliert, diese entsprechend der gewünschten Differenzierung stimuliert und mit Hilfe eines Cytokine-Capture-Assays markiert und durch FACS-Sorting gewonnen.

Die TRPM7-Ströme wurden wie in Kapitel 2.2.4 ausgelöst, analysiert und ausgewertet. Vergleicht man die beiden *in vitro* differenzierten Effektorzelltypen  $T_H1$  und  $T_H17$  elektrophysiologisch, zeigt sich lediglich ein geringer Unterschied in der maximalen TRPM7-Stromdichte. Bei 300 s haben die  $T_H1$ -Zellen eine Stromdichte für TRPM7 von  $34,7 \pm 6,5$  pA/pF, wohingegen die  $T_H17$  eine leicht kleinere maximale Stromdichte mit  $25,3 \pm 4,2$  pA/pF zeigen, vgl. **Tabelle 18**.



**Abbildung 17 Ganzzell-Patch-Clamp Vergleich der TRPM7-Stromdichte von *in vitro* differenzierten und FACS sortierten TH1- und TH17-Zellen.** 0 mM Mg<sup>2+</sup> Pipettenlösung und nominal Mg<sup>2+</sup> freier externer Lösung, TH1 (rot, n=5) und TH17-Zellen (blau, n = 8). **A)** Entwicklung der TRPM7 Stromdichte über 500 s. **B)** Stromspannungskurven bei 100 s aus einem repräsentativen Experiment; **C)** Stromspannungskurven bei 300 s nach Entwicklung des maximalen TRPM7-Stroms aus einem repräsentativen Experiment. **D)** Vergleich der mittleren Stromdichte ± Standardfehler bei 0 s. **E)** Vergleich der mittleren Stromdichte ± Standardfehler bei 100 s. **F)** Vergleich der mittleren Stromdichte ± Standardfehler bei 300 s., \*p<0,05 \*\*p<0,01; Studentischer T-Test.

Vergleicht man die Kinetik der Entwicklung des TRPM7-Stromes der beiden Zellpopulationen, zeigen die TH1-Zellen einen schnelleren Anstieg der TRPM7-Ströme. Bereits zu Beginn der Messung zeigen TH1-Zellen im Durchschnitt eine signifikant höhere Grundaktivität von TRPM7 mit  $10,3 \pm 1,4$  pA/pF im Vergleich zu  $3,9 \pm 0,6$  pA/pF in TH17-Zellen. Nach 100 s lässt sich immer noch eine signifikant höhere TRPM7-Stromdichte in TH1-Zellen messen. Die maximale Stromdichte wird in TH1-Zellen nach ca. 125 s erreicht, in TH17 erst nach ca. 250 s. Dieses spricht für eine schnellere Kinetik von TH1- gegenüber TH17-Zellen. Die maximale TRPM7-Stromdichte zeigt jedoch keinen signifikanten Unterschied (vgl. **Abbildung 17**).

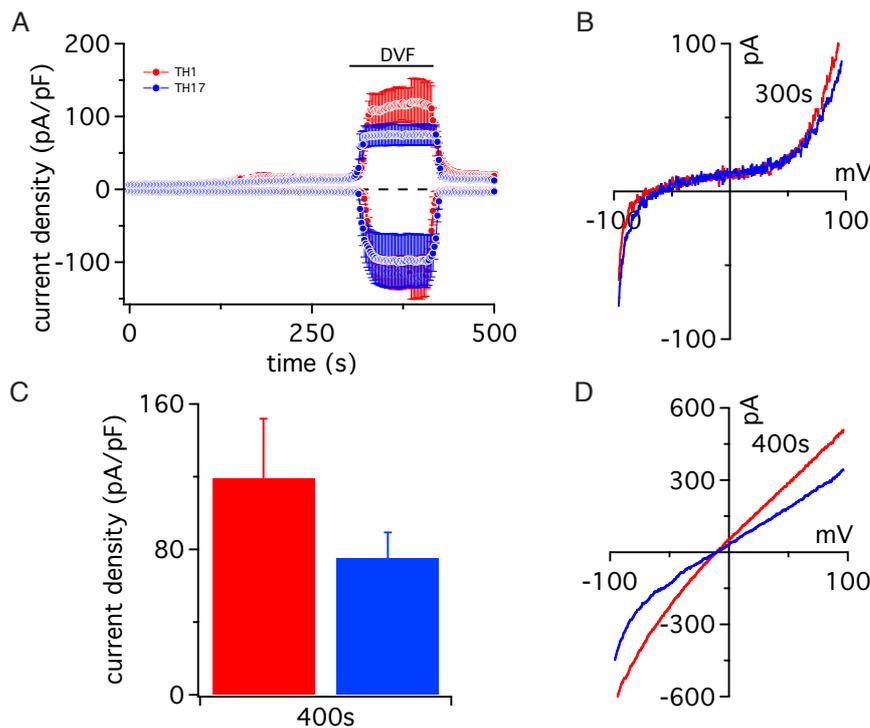
|                           | <b>T<sub>H1</sub></b> | <b>T<sub>H17</sub></b> |
|---------------------------|-----------------------|------------------------|
| Anzahl (n)                | 5                     | 8                      |
| Kapazität (pF)            | 4,2 ± 0,2             | 5,8 ± 0,6              |
| Stromdichte (pA/pF) 0 s   | 10,3±1,4              | 3,9±0,6                |
| Stromdichte (pA/pF) 100 s | 25,8 ± 5,2            | 9,8 ± 1,6              |
| Stromdichte (pA/pF) 300 s | 34,7 ± 6,5            | 25,3 ± 4,2             |

**Tabelle 18 Elektrophysiologischer Vergleich der in vitro differenzierten Effektorzellen TH1 und TH17 unter Mg<sup>2+</sup>-freien Bedingungen.** Ganzzell-Patch-Clamp extrahiert bei +80 mV mit 0 mM Mg<sup>2+</sup> Pipettenlösung und nominal Mg<sup>2+</sup>-freier externer Lösung.

*Vergleich funktioneller Expression von TRPM7 in T<sub>H1</sub> und T<sub>H17</sub> Effektorzellen mittels bivalentfreier Lösung*

Die verwendeten T<sub>H1</sub>- und T<sub>H17</sub>-Zellen wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartner Prof. Dr. med. Schulze-Koops zur Verfügung gestellt (s. Methodenteil).

Die Zellen wurden bei 2 mM Mg<sup>2+</sup> in der externen Lösung und 0 mM Mg<sup>2+</sup> in der Pipettenlösung im Ganzzellmodus elektrophysiologisch charakterisiert. Nach dem Erreichen eines stabilen Amplitudenmaximums (300 s) wurde mit Hilfe einer zweiten Pipette für 100 s bivalent-freie Lösung appliziert. **Abbildung 17 A** zeigt die Stromdichte über die Zeit mit der Erhöhung der Stromamplitude während der Applikation von bivalentfreier Lösung, in Teil B ist die für TRPM7 typische Stromspannungskurve vor der Applikation, aus einem repräsentativen Experiment, gezeigt. **Abbildung 7 C** zeigt korrespondierend dazu die näherungsweise linearen Stromspannungskurven bei Applikation von bivalentfreier Lösung. Messungen, die keine typischen Stromspannungskurven zeigten, wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

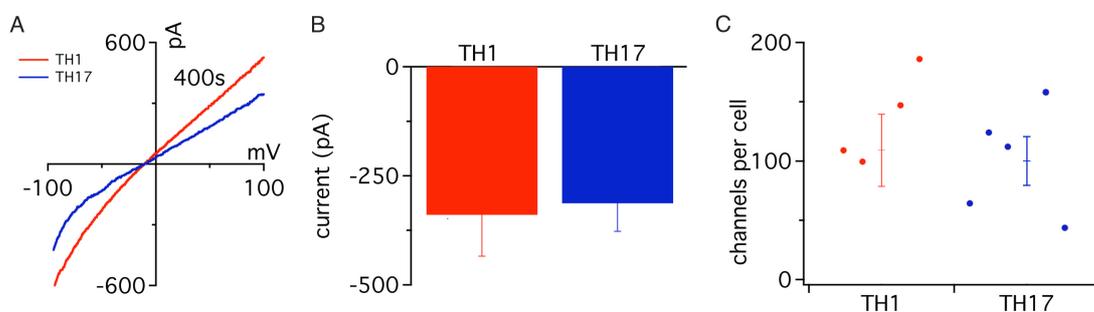


**Abbildung 18 Ganzzell-Patch-Clamp Vergleich der Stromdichte von TRPM7 *in vitro* differenzierte und FACS sortierte TH1 (rot, n=4) und TH17-Zellen (blau, n=5). 0 mM Mg<sup>2+</sup> Pipettenlösung, externe Lösung mit 2 mM Mg<sup>2+</sup>. A) Representative Stromspannungskurve über 500 s mit Applikation von bivalentfreier Lösung (DVF–300 s bis 400 s). B) Stromspannungskurve bei 300 s vor der Applikation von bivalentfreier Lösung, aus einem repräsentativen Experiment; C) Vergleich der mittleren Stromdichte ± Standardfehler bei 400 s, während der Applikation von bivalentfreier Lösung D) Stromspannungskurve bei 400 s während der Applikation von bivalentfreier Lösung, aus einem repräsentativen Experiment.**

Sowohl die untersuchten TH1- als auch TH17-Zellen zeigten die erwartete Reaktion auf die Applikation von bivalentfreier Lösung und die Stromspannungskurve liniarisierte sich, vgl. **Abbildung 17**. Die Stromdichte des Auswärtsstroms der TH1-Zellen (n=4) erhöhte sich durch die Applikation der bivalentfreien Lösung von  $16,8 \pm 3,4$  pA/pF bei 290 s auf  $111,2 \pm 22,4$  pA/pF bei 350 s. Die TRPM7 Auswärtsströme der TH17-Zellen (n=5) zeigten eine ähnliche Dynamik mit insgesamt kleineren Strömen mit  $13,4 \pm 2,4$  pA/pF bei 290 s und  $74,3 \pm 14,5$  pA/pF. Beide Zellpopulationen zeigten im Mittel nach der Beendigung der Applikation von bivalentfreier Lösung eine Normalisierung der Ströme auf annähernd den Ausgangswert.

|                           | <b>T<sub>H</sub>1</b> | <b>T<sub>H</sub>17</b> |
|---------------------------|-----------------------|------------------------|
| Anzahl (n)                | 4                     | 5                      |
| Kapazität (pF)            | 4.3                   | 4.6                    |
| Stromdichte (pA/pF) 290 s | 16,8 ± 3,4            | 13,4 ± 2,4             |
| Stromdichte (pA/pF) 350 s | 111,2 ± 22,4          | 74,3 ± 14,5            |
| Stromdichte (pA/pF) 450 s | 21,3 ± 4,9            | 14,0 ± 1,5             |

**Tabelle 19 Elektrophysiologischer Vergleich der durchschnittlichen Stromdichte der Auswärtsströme von *in vitro* differenzierten T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>17 Effektorzellen in physiologischer Mg<sup>2+</sup>-Konzentration.** Ganzzell-Patch-Clamp bei +80 mV mit 2 mM Mg<sup>2+</sup>-haltiger externer Lösung und Mg<sup>2+</sup>-freier interner Lösung.



**Abbildung 19 Ganzzell-Patch-Clamp Analyse von Strömen mit 0 mM Mg<sup>2+</sup> Pipettenlösung und bivalentfreier externer Lösung.** T<sub>H</sub>1 (rot, n=4), T<sub>H</sub>17 (blau, n=5) **A)** Stromspannungskurven bei 400 s während der Applikation von bivalentfreier Lösung, aus jeweils einem repräsentativen Experiment. **B)** Vergleich der negativen TRPM7 Einwärtsströme bei 400s während der Applikation von bivalentfreier Lösung. **C)** Anzahl der TRPM7 Kanäle pro Zelle.

Die aus dem negativen Einwärtsstrom während der Applikation von bivalentfreier Lösung berechnete Anzahl der TRPM7 Ströme pro Zelle zeigt zwischen T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>17 Effektorzellen keine signifikanten Unterschiede.

### 3.4.2 Vergleich aller T-Helfer-Populationen bei Mg<sup>2+</sup>-freier externer Lösung

Wie erwartet, zeigten alle untersuchten T-Helfer-Subpopulationen eine TRPM7-Expression. Die vier untersuchten T-Helfer-Untergruppen unterschieden sich in ihrem Entwicklungsstand und -ort. Die naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen und die nT<sub>regs</sub> entwickelten sich *in vivo* im Thymus und wurden direkt isoliert. Die T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Effektorzellen wurden *in vitro* aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen differenziert. Danach wurde die entstandene

Mischpopulation auf ihre ausgeschütteten Interleukine mit Hilfe eines Interleukin-Capture-Assays (sh. Methodenteil) aufgetrennt.

Wie in **Tabelle 20 B** dargestellt, unterschieden sich damit die untersuchten Zellpopulationen signifikant in ihrer Kapazität. Die dargestellten Kapazitäten errechnen sich aus allen Einzelkapazitäten über die Zeit aller Messungen und sind in Picofarad (pF) angegeben. Die kleinste Kapazität zeigte sich im Mittel in der Population der naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit  $1,24 \pm 0,2$  pF. Diese ist signifikant kleiner als die der T<sub>H</sub>1-Zellen mit  $4,2 \pm 0,2$  pF und hoch signifikant kleiner als die Kapazität der T<sub>H</sub>17-Zellen mit  $5,8 \pm 0,6$  pF. Die zweitkleinste Kapazität zeigten die nT<sub>regs</sub> mit  $1,46 \pm 0,5$  pF. Dieser Wert ist nicht signifikant größer als die Kapazität der naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen, zeigt aber auch eine Signifikanz gegenüber T<sub>H</sub>1-Zellen und eine hohe Signifikanz gegenüber T<sub>H</sub>17-Zellen. Die Kapazitäten von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen zeigen zueinander keine signifikanten Unterschiede. Damit bilden sich zwei Gruppen: Die direkt isolierten naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen und nT<sub>regs</sub> haben eine geringere Kapazität als die differenzierten Zellen T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>17. Um die Unterschiede in der Kapazität in der Auswertung auszugleichen, werden im Folgenden immer die Stromdichtewerte angegeben.

A)

|                              | $T_{naive}$ | $T_{H1}$   | $T_{H17}$  | $nT_{reg}$  |
|------------------------------|-------------|------------|------------|-------------|
| Anzahl (n)                   | 7           | 5          | 8          | 12          |
| Kapazität (pF)               | 1,24 ± 0,2  | 4,2 ± 0,2  | 5,8 ± 0,6  | 1,46 ± 0,5  |
| Stromdichte<br>(pA/pF) 100 s | 39,6 ± 3,6  | 25,8 ± 5,2 | 9,8 ± 1,6  | 23,00 ± 3,6 |
| Stromdichte<br>(pA/pF) 300 s | 56,4 ± 4,7  | 34,7 ± 6,5 | 25,3 ± 4,2 | 42,2 ± 4,4  |

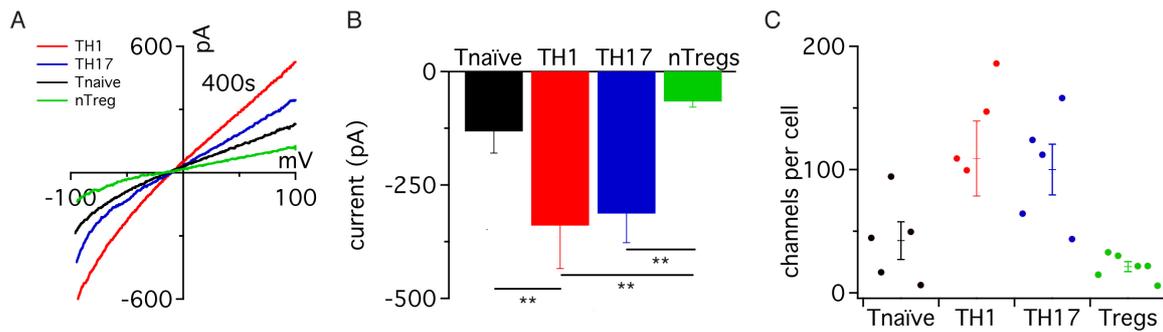
B)

|                              | $T_{naive}$  | $T_{H1}$     | $T_{H17}$   | $nT_{reg}$  |
|------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| Zellanzahl                   | 5            | 4            | 5           | 6           |
| Kapazität (pF)               | 1.6          | 4.3          | 4.6         | 1.9         |
| Stromdichte<br>(pA/pF) 290 s | 39,5 ± 8,5   | 16,8 ± 3,4   | 13,4 ± 2,4  | 21,4 ± 4,5  |
| Stromdichte<br>(pA/pF) 350 s | 147,3 ± 28,7 | 111,2 ± 22,4 | 74,3 ± 14,5 | 67,4 ± 13,1 |
| Stromdichte<br>(pA/pF) 450 s | 41,3 ± 12,5  | 21,3 ± 4,9   | 14,0 ± 1,5  | 26,8 ± 6,7  |

**Tabelle 20 Vergleich der durchschnittlichen Stromdichte der Auswärtsströme bei +80 mV von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen, T<sub>H1</sub>, T<sub>H17</sub> und nT<sub>regs</sub>.** **A)** Ganzzell-Patch-Clamp bei +80 mV mit 0 mM Mg<sup>2+</sup> Pipettenlösung und nominal Mg<sup>2+</sup>-freier externer Lösung. **B)** Ganzzell-Patch-Clamp bei +80 mV mit 2 mM Mg<sup>2+</sup>-haltiger externer Lösung und Mg<sup>2+</sup>-freier interner Lösung.

### *TRPM7 Kanäle pro Zelle*

Um einen vollständigen Eindruck von der TRPM7-Expression der verschiedenen Zellpopulationen zu bekommen, wurden neben der Stromdichte auch die TRPM7-Kanäle pro Zelle berechnet. Die verschiedenen Zellpopulationen unterschieden sich wesentlich in ihrer Kapazität, was mathematisch in die Normalisierung der Ströme Eingang fand. Um einen Eindruck von der Anzahl der tatsächlichen Kanäle pro Zelle zu gewinnen, wurden die bei -80 mV gemessenen mittleren negativen Einwärtsströme während der Applikation von bivalentfreier Lösung bestimmt und anhand bekannter Einzellkanalmessungen für TRPM7, die Kanäle pro Zelle bestimmt (vgl. Methodenteil).



**Abbildung 20 Ganzzell-Patch-Clamp Analyse von Strömen mit 0 mM Mg<sup>2+</sup> Pipettenlösung und bivalentfreier externer Lösung.** T<sub>naive</sub> (schwarz, n=5), T<sub>H1</sub> (rot, n=4), T<sub>H17</sub> (blau, n=5), nT<sub>reg</sub> (grün, n=6)  
**A)** Stromspannungskurven bei 400s während der Applikation von bivalentfreier Lösung, aus jeweils einem repräsentativen Experiment. **B)** Vergleich der negativen TRPM7 Einwärtsströme (in pA) bei 400s während der Applikation von bivalentfreier Lösung. **C)** Errechnete Anzahl der TRPM7 Kanäle pro Zelle. Anova-Test \*\*p<0,01.

Vergleicht man die Anzahl der TRPM7 Kanäle pro Zelle, zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen T-Helfer-Untergruppen. Die *in vivo* herangereiften Zellen zeigten eine deutlich geringere Kanalanzahl pro Zelle als die *in vitro* differenzierten Effektorzellen. Die wenigsten Kanäle pro Zelle besaßen die nT<sub>regs</sub> mit 32 ± 3 Kanäle, die größte Anzahl Kanäle pro Zelle konnte bei T<sub>H1</sub>-Zellen mit 115 ± 22 gemessen werden (vgl. **Tabelle 21**). Dies lässt vermuten, dass TRPM7 in CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen hochreguliert wird und besonders in T<sub>H1</sub>-Zellen von entscheidender Bedeutung ist.

|                      | T <sub>naive</sub> | T <sub>H1</sub> | T <sub>H17</sub> | nT <sub>reg</sub> |
|----------------------|--------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| Kapazität (pF)       | 1.6                | 4.3             | 4.6              | 1.9               |
| TRPM7-Kanäle / Zelle | 63 ± 7             | 115 ± 22        | 93 ± 15          | 32 ± 3            |

**Tabelle 21 Vergleich naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen, T<sub>H1</sub>, T<sub>H17</sub> und nT<sub>regs</sub> mit 0 mM Mg<sup>2+</sup> Pipettenlösung und bivalentfreier externer Lösung.** Die Kapazität entspricht dem Mittelwert aller gemessenen Einzelmesspunkte. Alle angegebenen Ströme entsprechen dem Mittelwert zum angegebenen Zeitpunkt. Alle Werte sind mit dem entsprechenden Standardfehler angegeben.

## 4 Diskussion

Die in vorliegender Arbeit ausgewerteten Versuche legen einen Einfluss von TRPM7 auf immunologische Prozesse nahe.

TRPM7 ist ein ubiquitär exprimierter  $Mg^{2+}$ -Kanal. Alle bis dato untersuchten Zellen weisen eine TRPM7-Expression an der Oberfläche auf, darunter auch ruhende und aktivierte T-Lymphozyten [23, 62, 117-120]. Dies steht im Einklang damit, dass sich in allen untersuchten T-Lymphozyten-Subtypen TRPM7 nachweisen lässt.

Im Besonderen konnte ich in meiner Doktorarbeit Unterschiede der funktionellen TRPM7-Expression von verschiedenen T-Zell-Subpopulationen darlegen.

Die verschiedenen untersuchten T-Lymphozyten zeigten im Verhalten bezüglich variierender  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen eine unterschiedliche Reaktion. Dabei führte fehlendes  $Mg^{2+}$  zu einer stärkeren Aktivierung des TRPM7-Kanals in  $nT_{regs}$  als in naiven  $CD4^+$  T-Zellen. Entsprechend konnte ein negativer Einfluss eines erhöhten  $Mg^{2+}$ -Spiegels auf die Differenzierung von  $iT_{regs}$  nachgewiesen werden. Damit im Einklang steht, dass die Differenzierung von  $CD4^+ CD25^-$  Lymphozyten zu  $iT_{regs}$  sowohl durch TRPM7-Inhibition als auch durch die Wegnahme von  $Mg^{2+}$  aus dem Medium positiv beeinflusst wird.

Es konnte bereits die Relevanz anderer Kanäle, insbesondere der CRAC-Kanäle (Ca<sup>2+</sup>-release-activated Ca<sup>2+</sup> channels), bei der Aktivierung von T-Zellen gezeigt werden [118, 121-123].

Auch für den Ionenkanal TRPM7 ließen sich bereits verschiedene Funktionen im Immunsystem nachweisen [27, 123-127].

So führte die Deletion von TRPM7 in DT40-Huhn-B-Lymphozyten nicht nur zu einer gestörten Proliferation, sondern auch zu einer erhöhten Apoptose der B-Lymphozyten [22].

Darüberhinaus veröffentlichten Scharenberg et al. bereits, dass TRPM7 eine entscheidende Rolle bei der Proliferation von Lymphozyten spielt. Dabei interagiert TRPM7 mit dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg, welcher das Gleichgewicht zwischen Anabolismus und Katabolismus steuert [40, 128]. Damit ist TRPM7 neben PI3K ein

wichtiger Bestandteil der Steuerung des Lymphozyten-Stoffwechsels. Conforti et al. konnten weiterhin eine Rolle von TRPM7 bei der Migration von aktivierten T-Lymphozyten nachweisen [41].

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die T-Helfer-Subgruppen sich bei ihrer elektrophysiologischen Charakterisierung in der Anzahl ihrer TRPM7-Kanäle pro Zelle unterscheiden. Zunächst wurden hierfür die beiden *in vivo* im Thymus entstandenen T-Lymphozytensubgruppen nT<sub>regs</sub> und naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen verglichen.

#### 4.1.1 Vergleich von nT<sub>regs</sub> und naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass unterschiedliche Zellen eine unterschiedliche TRPM7-Expression zeigen. So konnten Nadler et al. zeigen, dass unter Versuchsbedingungen T-Jurkats eine höhere Stromdichte aufwiesen als HEK-293-Zellen [23]. Postulierte man einen Einfluss der Stromdichte von TRPM7 auf verschiedene Zellfunktionen, stellt sich die Frage, ob auch zwischen verschiedenen T-Zell-Subgruppen ein phänotypischer Unterschied besteht.

Der Vergleich von nT<sub>regs</sub> und naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde aufgrund der ähnlichen *in vivo* Entwicklung im Thymus und der direkten Isolation aus Patientenblut (*ex vivo*) ohne zusätzliche Aktivierung gewählt. Dadurch zeigten die gewonnenen Zellen ähnliche Membrankapazitäten. In der elektrophysiologischen Charakterisierung wiesen nT<sub>regs</sub> eine signifikant geringere funktionelle TRPM7-Expression als die naiven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten auf. Außerdem zeigten die untersuchten nT<sub>regs</sub> eine stärkere Aktivierung von TRPM7 bei fehlendem Mg<sup>2+</sup>, als naive CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten.

Unsere weiteren Ergebnisse mit *in vitro* differenzierten Effektorzellen weisen auf eine höhere Expression von TRPM7 in differenzierten Effektorzellen gegenüber naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen hin. Umso bemerkenswerter ist es, dass nT<sub>regs</sub> die geringste funktionelle TRPM7-Expression zeigten. Im Gegensatz dazu zeigten naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen die größte TRPM7-Kanalaktivität normiert auf ihre Zellgröße, dargestellt als Stromdichte (pA/pF). Dies ist möglicherweise aber lediglich ein Effekt der extrem kleinen Zellgröße der naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ca. 0.71-1.88 pF. Es wäre gut möglich, dass die Aufrechterhaltung der zellulären Mg<sup>2+</sup>-Homöostase eine Mindestanzahl an funktionellen TRPM7-Kanälen voraussetzt. T-Lymphozyten können sich nach einer Aktivierung in ihrer Grö-

ße verfünffachen. Dies ist notwendig, um ihre zahlreichen Effektor-Funktionen auszuführen und entsprechende Zytokine zu synthetisieren.

Schmitz und Perraud et al. konnten bereits 2003 zeigen, dass eine Deletion von TRPM7 zu einer gestörten Proliferation von 293-HEK-Zellen und DT40-Huhn-B-Lymphozyten führt [22]. Die TRPM7-Knockout-Zellen gehen in die Ruhephase des Zellzyklusses über [128]. Geht man von einem analogen Mechanismus für T-Lymphozyten aus, könnte die erhöhte TRPM7-Expression in naïven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten für eine höhere Proliferationsbereitschaft der aktivierungsbereiten naïven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten sprechen.

#### 4.1.2 Mögliche Magnesiumregulation durch TRPM7

Verschiedene Forschungsgruppen konnten einen Einfluss von Mg<sup>2+</sup> auf das Immunsystem nachweisen [106, 107]. Bereits 1930 wurde das erste Mal gezeigt, dass Mg<sup>2+</sup>-defiziente Ratten zu vermehrten Entzündungen neigen [105].

Da TRPM7 wichtig für die zelluläre und systemische Mg<sup>2+</sup>-Homöostase ist, ist ein Zusammenhang zwischen Immunantwort und TRPM7-Aktivität naheliegend [7, 22]. TRPM7 leitet jedoch nicht nur Mg<sup>2+</sup>, sondern wird auch durch intrazelluläre und extrazelluläre Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen reguliert [22, 23, 54].

Meine Ergebnisse zeigen eine unterschiedliche Veränderung der TRPM7-Ströme bei variierenden extrazellulären Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen in verschiedenen T-Zell-Subtypen. Die untersuchten nT<sub>regs</sub> zeigen unter annähernd physiologischer Mg<sup>2+</sup>-Konzentration in der externen Lösung geringere TRPM7-Ströme als die naïven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Wird als externe Lösung hingegen eine Mg<sup>2+</sup>-freie Lösung verwendet, kommt es zu einem wesentlich stärkeren prozentualen Anstieg der TRPM7-Ströme in nT<sub>regs</sub>, als in den naïven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Eine mögliche Ursache wäre die Aufrechterhaltung der intrazellulären Mg<sup>2+</sup>-Homöostase, welche bei einer geringeren Kanalanzahl in nT<sub>regs</sub> nur durch eine stärkere Zunahme der Ströme erhalten bleibt.

#### 4.1.3 Eine TRPM7-Blockade führt zu einer gesteigerten iT<sub>reg</sub>-Differenzierung

Der Einfluss von TRPM7 auf die Differenzierung von T-Lymphozyten konnte bereits durch Jin und Desai et al. gezeigt werden. Gewebespezifische Deletion von TRPM7 in der T-Zelllinie führte zu einer gestörten Thymopoese, welche zu einem Differenzierungsblock der Lymphozyten in der doppelt-negativen Stufe und zu einer fortschreitenden Verarmung an Thymus-Markzellen führte [62].

Aufgrund der unterschiedlichen TRPM7-Expression der T-Lymphozyten-Untergruppen in der elektrophysiologischen Charakterisierung und der herausragenden Rolle von T<sub>regs</sub> im Immunsystem wurde die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen zu iT<sub>regs</sub> untersucht.

Interessanterweise konnte durch die gezielte Blockade von TRPM7 durch Waixenicin A und NS8593 die Differenzierungsrate zu iT<sub>regs</sub> gegenüber der Kontrollgruppe signifikant gesteigert werden.

Das lässt auf einen direkten oder indirekten negativen Einfluss der TRPM7-Kanalaktivität auf die Differenzierung von iT<sub>regs</sub> schließen. Sollte sich dieser Effekt von TRPM7 auf die Differenzierung der immunregulatorischen iT<sub>regs</sub> bestätigen, wäre ein Einfluss von TRPM7 auf die Immunbalance naheliegend.

Dieses steht im Einklang mit den von mir durchgeführten Mg<sup>2+</sup>-Experimenten, die zeigen konnten, dass es bei reduziertem Mg<sup>2+</sup> im Kulturmedium ebenfalls zu einer Steigerung der iT<sub>reg</sub>-Differenzierung kommt. Die gezielte Erhöhung der iT<sub>reg</sub>-Population *in vivo* könnte als therapeutische Option bei Autoimmunkrankheiten eine Rolle spielen.

#### 4.1.4 Mg<sup>2+</sup> wirkt sich negativ auf die iT<sub>reg</sub>-Differenzierung aus

Meine Ergebnisse zeigen einen dosisabhängigen Einfluss von Mg<sup>2+</sup> auf die Differenzierung von iT<sub>regs</sub>. Bei einer Steigerung der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration im Kulturmedium kommt es zu einer Reduktion der Differenzierungsrate von iT<sub>regs</sub>. Verwendet man hingegen Mg<sup>2+</sup>-freies Kulturmedium so kommt es zu einer Steigerung der Differenzierungsrate der iT<sub>regs</sub>. Ein Mg<sup>2+</sup>-Defizit führt damit in den Versuchen zu einer verstärkten Differenzierung von iT<sub>regs</sub>, welches *in vivo* zu einer Schwächung des Immunsystems

führen könnte. Damit im Einklang steht das Auftreten von Immunschwächen bei einem  $Mg^{2+}$ -Defizit [106, 107].

In der Literatur mehren sich Beispiele einer verstärkten Immunantwort bei einer Reduktion von  $T_{reg}$ -Zellen. Suvas et al. zeigten dies bei der Immunantwort auf HSV-Viren [129]. Ähnliches zeigte auch Cabrera et al. für Hepatitis C [130]. Dittmer et al. zeigten eine funktionelle Beeinträchtigung von  $CD8^+$  T-Zellen durch regulatorische T-Zellen bei anhaltender retroviraler Infektion [131].

Weiterhin ließ sich zeigen, dass eine erhöhte  $Mg^{2+}$ -Konzentration im Medium durch eine gezielte Blockade von TRPM7 ausgeglichen werden konnte. Es zeigte sich eine ähnliche Rate differenzierter  $iT_{regs}$  wie in der Kontrolle unter Normalbedingungen.

#### 4.1.5 Die TRPM7-Kinase hat keinen Einfluss auf murine $iT_{regs}$

Romagnani et al. konnten kürzlich zeigen, dass die TRPM7-Kinase-Aktivität in Mäusen keinen Einfluss auf die Differenzierung von  $nT_{regs}$  hat [125]. Dafür wurde die Thymopoese von TRPM7-Kinase-defizienten Mutanten ( $Trpm7^{R/R}$ ) untersucht. Die Kinase wurde mittels Punktmutation inaktiviert. Bei der Analyse dieser Mäuse zeigte sich, dass die enzymatische Aktivität des Rezeptors nicht essentiell für die Thymopoese ist, aber für CD103-Transkription und Darm-Homing von intraepithelialen Lymphozyten benötigt wird.

Die durchgeführte *in vitro*-Polarisation von naiven  $CD4^+$  T-Zellen zu  $T_H1$ -,  $T_{reg}$ - und  $T_H17$ -Zellen zeigte einen selektiven Defekt von  $TRPM7^{R/R}$ - $CD4^+$ -T-Zellen zur Polarisation in Rorc- und IL-17-exprimierende Zellen. Ein Mangel an TRPM7-Kinaseaktivität führt zu einer beeinträchtigten Transaktivierung von SMAD2-Zielgenen, einschließlich Itgae (kodierend für CD103), Il-17 und Rorc, wodurch die Differenzierung der  $T_H17$ -Zellen, nicht aber der  $T_{reg}$ -Zellen, selektiv eingeschränkt wird [125].

Kombiniert mit unseren Ergebnissen lassen diese Daten vermuten, dass die TRPM7-Kanalaktivität, aber nicht die Kinasefunktion, wichtig für die Regulation der Differenzierung von humanen  $iT_{regs}$  ist. Dies ist Gegenstand aktueller Forschung und würde gegebenenfalls auch gezielte therapeutische Optionen eröffnen. Durch eine Blockierung des TRPM7-Kanals könnte die Rate an  $T_{reg}$ -Zellen gesteigert werden und damit eine gestörte Immunbalance z.B. bei Autoimmunerkrankungen ausgeglichen

werden. Entsprechend der Daten von Romagnani et al. könnte hingegen die Inaktivierung der Kinase zu einer möglichen Regulation von überschießenden T<sub>H</sub>17-Zell-Antworten führen.

#### 4.1.6 Ausblick

Es konnte mit dieser Arbeit ein möglicher Einfluss der TRPM7-Kanalaktivität auf die Differenzierung von T-Zellen gezeigt werden.

Es bedarf weiterer Forschung zur Bestätigung der gezeigten Ergebnisse, aber auch zur Untersuchung weiterer T-Zell-Substypen und deren Beeinflussung durch TRPM7, um die Rolle von TRPM7 im Immunsystem besser verstehen zu können.

Es konnten bessere Ergebnisse der iT<sub>reg</sub>-Differenzierung unter der Blockade von TRPM7 nachgewiesen werden. Um ein genaueres Verständnis vom Einfluss von TRPM7 auf die *in vivo* ablaufende Differenzierung von T-Zellen zu erlangen, wäre eine Untersuchung anderer T-Zell-Differenzierungen spannend. Weitere Untersuchungen wären auch im Hinblick auf mögliche therapeutische Anwendungen unabdingbar.

Weiterhin werfen die Daten die Frage auf, ob und inwieweit die Zellen durch die gezielte Beeinflussung der Differenzierung ihre Funktionalität beibehalten. Um dieser Frage nachzugehen wären zunächst Suppressionsassays denkbar, aber *in vivo*-Versuche unverzichtbar.

*In vitro* konnte ich einen Einfluss von Veränderungen des Mg<sup>2+</sup>-Gehalts auf die Differenzierung von iT<sub>regs</sub> nachweisen. Der aufgefundene negative Effekt von Magnesium auf die iT<sub>reg</sub>-Differenzierung könnte ein Indiz für eine Beeinflussung des Immunsystems durch eine Alteration im menschlichen Magnesiumhaushalt sein.

Insbesondere bei schweren nephrologischen Erkrankungen sind Elektrolytentgleisungen häufig. Dabei findet aktuell die Bestimmung von Natrium, Kalium und Kalzium eine klinische Bedeutung.

Die Grenzwerte sind dabei aufgrund bekannter Nebenwirkungen auf Herz, Gehirn und Knochen gewählt. Die Bestimmung von Magnesiumspiegeln im Serum ist in der klinischen Routine deutlich seltener. Häufig wird bei Verdacht auf Magnesiummangel kalkuliert therapiert. Die mögliche Beeinflussung des Immunsystems findet bis heute

keine bis wenig klinische Beachtung, weshalb weitere Forschung auf diesem Gebiet zur besseren Patientenversorgung unbedingt nötig ist.

## 5 Abkürzungsverzeichnis

|                   |   |
|-------------------|---|
| ADP               | Adenosindiphosphat  |
| APC               | Allophycocyanin   |
| APZ               | Antigenpräsentierende Zellen  |
| BSA               | Bovines Serumalbumin  |
| CHAK1             | channel-kinase 1  |
| CD                | Cluster of Differentiation („Unterscheidungsgruppen“)                                       |
| C-Terminus        | Carboxy-Terminus  |
| DAG               | Diacylglycerine   |
| EDTA              | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| EGTA              | Ethylenglycolbistetraessigsäure   |
| FACS              | fluorescence-activated cell sorting Durchflusszytometrie                                    |
| FCR               | fragment crystallisable receptor  |
| FCS               | fetal calf serum / fetales Kälberserum  |
| FOXP3             | Forkhead-Box-Protein P3   |
| HEK               | Human Embryonic Kidney/ menschliche embryonale Nierenzellen                                 |
| HEPES             | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure                                       |
| IFN-gamma         | Interferon-gamma  |
| IL                | Interleukin   |
| IP3               | Inositoltrisphosphat-3  |
| iT <sub>reg</sub> | Induzierte regulatorische T-Helferzellen  |
| IV-curve          | Stromspannungskurve   |
| MACS              | Magnetic Activated Cell Sorting/ dt.: magnetisch aktivierte Zellsortierung                  |
| MagT1             | Magnesium Transporter 1   |
| MHC               | major histocompatibility complex  |
| mTOR.             | mechanistic Target of Rapamycin dt.: Mechanistisches Ziel von Rapamycin                     |
| mTORC1            | mechanistic target of rapamycin complex 1 dt.: Mechanistisches Ziel von Rapamycin Komplex 1 |
| NHS               | Normal human serum  |
| NH4Cl             | Ammoniumchlorid   |
| NS8593            | N-[(1R)-1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphthalenyl]-1H-Benzimidazol-2-amine hydrochloride            |
| nT <sub>reg</sub> | Natürliche regulatorische T-Zellen  |
| PMBC              | Peripheral Blood Mononuclear Cell/ dt.: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes           |
| PBS               | Phosphate-buffered saline/ Phosphatgepufferte Salzlösung                                    |
| PE                | Phycoerythrin   |
| PerCP             | Peridinin   |
| PIP               | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat  |

---

|                |  |
|----------------|--|
| PLC            | Phosphoinositid-Phospholipase C  |
| RCF            | relative centrifuge force/ Relative Zentifugalbeschleunigung   |
| SK-Kanäle      | small conductance calcium-activated potassium channels/<br>Calcium-aktivierte Kaliumkanäle mit kleiner Leitfähigkeit |
| SLC41A         | solute carriers dt: lösliche Träger  |
| S6K1           | Ribosomal protein S6 kinase beta-1   |
| TCM            | persistieren zentrale Gedächtniszellen   |
| TEM            | Effektorgedächtniszellen   |
| TGF-beta       | transforming growth factor $\beta$ , transformierender Wachstumsfaktor beta  |
| T <sub>H</sub> | T-Helferzellen   |
| TRP            | Transient receptor potential cation channel  |
| TRPM7          | Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7   |
| 4E-BP1         | Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1  |

# Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Phylogenetischer Baum der Säugetier TRP-Familie.** Der evolutionäre Abstand zeigt sich in der Länge der Äste angegeben als akzeptierte Punktmutationen, das ist die mittlere Anzahl von Substitutionen pro 100 Reste. Abbildung aus [3]. ..... 1
- Abbildung 2 Modulare Struktur von TRPM7.** TRPM7 (transient receptor potential cation channel M7) ist ein  $Mg^{2+}$ -permeabler Kanal, der als Chanzyme bezeichnet wird, weil er Ionenkanal- und Enzymfunktion in einem Molekül vereint. TRPM7 leitet neben  $Mg^{2+}$  auch andere zweiwertige Kationen und unterliegt einem negativen Rückkopplungsmechanismus mit  $Mg^{2+}$ . Physiologisch wurde er mit der Aufrechterhaltung der  $Mg^{2+}$ -Homöostase, sowie der Entwicklung, der Zellteilung und dem Überleben von Lymphozyten in Verbindung gebracht. Abbildung aus [27]. ..... 3
- Abbildung 3 Die verschiedenen T-Helferzelllinien, ihre Hauptregulatoren und charakteristischen Zytokine.** Naïve  $CD4^+$  T-Zellen und natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) reifen im Thymus heran. Je nach extrazellulärem Milieu, differenzieren sie in unterschiedliche Effektor-T-Zellen mit charakteristischen Effektorzytokinen. Modifiziert nach [74]. ..... 14
- Abbildung 4 FACS Analyse von nTregs nach Isolation aus Vollblut.** Representative Histogramme: die Färbung erfolgte A) via Isotyp und B) mit Fluoreszenzfarbstoff markiertem Anti-FoxP3 Farbstoff. .... 32
- Abbildung 5 FACS Analyse während der Isolation aus Vollblut.** A) Representativer Punkteplot von PBMCs. B/C) Representativer Punkteplot PBMC ungefärbt. D) Representativer Punkteplot PMBCs, Färbung erfolgte via, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter, Anti-CD4 und Anti-CD8 Antikörper. B) Representativer Punkteplot von  $CD4^+$  positiven Lymphozyten. Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen CD25 und CD4 Oberflächenmarker. E) Representativer Punkteplot  $CD4^+ CD25^+$  positiven Lymphozyten. Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen CD25 und CD4 Oberflächenmarker. .... 33
- Abbildung 6 Schematische Darstellung der Funktionsweise des verwendeten Capture-Assays.** Zugefügte Antikörper binden gleichzeitig an die Zelloberfläche und an einer zweiten Bindungsstelle von der Zelle exprimierte Stoffe. Diese werden durch einen zweiten zugeführten Antikörper markiert. Dieses Verfahren ermöglicht, Zellen nach ihren exprimierten Zytokinen zu sortieren. .... 34
- Abbildung 7 Elektrophysiologischer Set-Up.** A) Patch-Setup mit Mikroskop, interne und externe Elektrode, und Applikationsvorrichtung. B) Naïve  $CD4^+$  T-Zelle während der Patch-Clamp-Messung. .... 35
- Abbildung 8 Elektrophysiologische Charakterisierung von naïven  $CD4^+$  T-Zellen.** Ganzzell-Patch-Clamp Analyse von TRPM7-Strömen in naïven humanen T-Zellen mit  $Mg^{2+}$ -freier Pipettenlösung. **A-B)**  $Mg^{2+}$ -freie externe Lösung. **A)** Mittelwerte der Stromzeitkurven mit Standardfehler (n = 7). **B)** Repräsentative Stromspannungskurve extrahiert bei 300 s. **C-**

**E)** Externe Lösung mit 2 mM Mg<sup>2+</sup>. **C)** Mittlere Stromdichte aufgetragen über die Zeit ± Standardfehler. Applikation von bivalentfreier Lösung (DVF, engl.: divalent-free) ab 300 s bis 400 s (n=5). **D)** Stromspannungskurve (IV-Kurve) extrahiert bei 300s vor der Applikation von bivalentfreier Lösung, aus einem repräsentativen Experiment. **E)** Stromspannungskurve (IV-Kurve) extrahiert bei 400 s während der Applikation von bivalentfreier Lösung aus einem repräsentativen Experiment. .... 37

**Abbildung 9 Immunzytochemische Darstellung der TRPM7-Expression in verschiedenen T-Zell Subtypen.** Laser-Scanning-Mikroskopische (LSM) Aufnahmen einer Immunfärbung von *in vitro* differenzierten humanen T-Lymphozyten gefärbt mit rabbit-anti-TRPM7 Antikörper, Alomone #ACC-047 auf TRPM7. **A)** Representative Abbildung eines naiven CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>-T-Lymphozyten. **B)** Representative Abbildung eines CD4<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Lymphozyten. **C)** Representative Abbildung eines CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T<sub>H</sub>17-Lymphozyten. **D)** Representative Abbildung eines CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> natürlichen regulatorischen T-Lymphozyten (nT<sub>reg</sub>). **E)** Quantitative Analyse der Fluoreszenzintensität mittels ImageJ Software. Mittelwert der Fluoreszenzintensität von T<sub>H</sub>1-Zellen (rot, n = 14), T<sub>H</sub>17-Zellen (blau, n = 12), sowie nT<sub>regs</sub> (grün, n = 11). Statistik: ANOVA \*\*\* = P < 0.0001. .... 42

**Abbildung 10 Elektrophysiologische Charakterisierung der Aktivität des TRPM7 Kanals in T-Zellen.** Vergleich der TRPM7-Kanalaktivität direkt isolierter naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen (schwarz, n=7) und natürlichen T<sub>reg</sub>-Zellen (nT<sub>regs</sub>, grün, n=12) mittels Ganzzell-Patch-Clamp Analyse. Gemessen wurde mit Mg<sup>2+</sup>-freier Pipettenlösung und nominal Mg<sup>2+</sup>-freier externer Lösung um TRPM7 Ströme zu maximieren. **A)** Vergleich der Mittelwerte der Stromdichte über die Zeit ± Standardfehler. **B)** Stromspannungskurve (IV-Kurve) bei 300s aus je einem repräsentativen Experiment. **C)** Vgl. der mittleren Stromdichte bei 300 s ± Standardfehler, \* p < 0,05, Studentischer T-Test. .... 44

**Abbildung 11 Elektrophysiologische Quantifizierung der TRPM7 Kanal-Expression.** Ganzzell-Patch-Clamp Vergleich nT<sub>reg</sub>-Zellen (grün, n=6) und naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen (schwarz, n=5), 0 mM Mg<sup>2+</sup> Pipettenlösung, externe Lösung mit 2 mM Mg<sup>2+</sup>. **A)** Stromspannungskurve über 500 s mit Applikation von bivalentfreier Lösung (engl.: divalent-free, DVF) **B)** Stromspannungskurven bei 300s nach Entwicklung des maximalen TRPM7-Stroms aus einem repräsentativen Experiment; **C)** Vergleich der mittleren Stromdichte bei 300 s **D)** Stromspannungskurven bei 400 s während der Applikation von bivalentfreier Lösung aus einem repräsentativen Experiment; **E)** Vergleich der mittleren Stromdichte bei 400 s **F)** Vergleich funktionsfähiger, membranständiger Kanäle pro Zelle. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, Studentischer T-Test. .... 45

**Abbildung 12 Regulation der TRPM7 Stromdichte durch extrazelluläres Mg<sup>2+</sup>.** Ganzzell-Patch-Clamp Vergleich der Stromdichte von TRPM7 bei verschiedenen extrazellulären Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen in nT<sub>reg</sub>-Zellen (grün, n=6) und naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen (schwarz, n=5). 0 mM Mg<sup>2+</sup> Pipettenlösung. **A)** externe Lösung mit 2 mM Mg<sup>2+</sup> oder nominal Mg<sup>2+</sup>-frei. **B)** Delta der Stromdichte bei 2 mM Mg<sup>2+</sup> und nominal Mg<sup>2+</sup>-freier Lösung. p < 0.05. .... 47

**Abbildung 13 Effekt verschiedener Mg<sup>2+</sup>-Konzentration auf die Differenzierung von iT<sub>regs</sub>.** FACS-Analyse nach 3 Tagen Differenzierung mit TGF-beta und IL-2 mit Hilfe eines intrazellulären Anti-FOXP3 Antikörpers. Ergebnisse wurden auf die Kontrolle normiert.

Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Die Kontrolle (ctrl; n = 12) unterschied sich signifikant von 10 mM  $Mg^{2+}$ , (n = 9). Anova-Test \* $p < 0,05$ . ..... 49

**Abbildung 14 Einfluss DMSO auf die Differenzierung von iTregs.** Inkubation über 7 Tage mit TGF-beta, Anti- $\alpha$ CD3/28, Retinsäure und IL-2 mit (n=8) oder ohne 0.1% DMSO (n=8); alle 2 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Quantitative Analyse mittels FOXP3-Antikörper-Färbung und FACS-Analyse. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsansätzen. 50

**Abbildung 15 Einfluss der Blockade von TRPM7 auf die Differenzierung von iT<sub>regs</sub>.** Inkubation von CD25<sup>-</sup>-T-Zellen über 7 Tage mit TGF-beta, Anti- $\alpha$ CD3/28, Retinsäure und IL-2, Mediumwechsel alle 2 Tage. Quantitative Auswertung mittels FOXP3-Antikörper-Färbung und FACS-Analyse. Delta FoxP3 normalisiert zur Kontrollbedingung. A) iT<sub>reg</sub> Differenzierung unter Kontrollbedingungen (n=14) verglichen mit der Zugabe von TRPM7-Inhibitoren NS8593 (Endkonzentrationen von 10  $\mu$ M (n=8) und 30  $\mu$ M (n=8)). B) iT<sub>reg</sub> Differenzierung unter Kontrollbedingungen (n=14) verglichen mit der Zugabe von Waixenicin A (Endkonzentrationen von 10  $\mu$ M (n=11) und 30  $\mu$ M (n=5)) Signifikanzen angegeben zur Kontrollbedingung Anova-Test \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ . ..... 51

**Abbildung 16 Effekt von erhöhtem  $Mg^{2+}$  und gleichzeitiger TRPM7-Blockade (Rettungs-experiment)** - Inkubation von CD25<sup>-</sup>-T-Zellen mit TGF-beta, Anti- $\alpha$ CD3/28, Retinsäure und IL-2 für 3 Tage. Quantitative Analyse mittels FOXP3-Antikörper-Färbung und FACS-Analyse. Kontrollbedingungen entsprechend 1,2-1.8 mM  $Mg^{2+}$  (n=20) verglichen mit Kulturmedium mit 6 mM  $Mg^{2+}$  (n=20) und Kulturmedium mit 6 mM  $Mg^{2+}$  und Zusatz von 30  $\mu$ M Waixenicin A (n=12). Signifikanz bezogen auf die Kontrolle, Anova-Test \* $p < 0,05$ . ..... 52

**Abbildung 17 Ganzzell-Patch-Clamp Vergleich der TRPM7-Stromdichte von *in vitro* differenzierten und FACS sortierten T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen.** 0 mM  $Mg^{2+}$  Pipettenlösung und nominal  $Mg^{2+}$  freier externer Lösung, T<sub>H</sub>1 (rot, n=5) und T<sub>H</sub>17-Zellen (blau, n = 8). A) Entwicklung der TRPM7 Stromdichte über 500 s. B) Stromspannungskurven bei 100 s aus einem repräsentativen Experiment; C) Stromspannungskurven bei 300 s nach Entwicklung des maximalen TRPM7-Stroms aus einem repräsentativen Experiment. D) Vergleich der mittleren Stromdichte  $\pm$  Standardfehler bei 0 s. E) Vergleich der mittleren Stromdichte  $\pm$  Standardfehler bei 100 s. F) Vergleich der mittleren Stromdichte  $\pm$  Standardfehler bei 300 s., \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ ; Studentischer T-Test. .... 54

**Abbildung 18 Ganzzell-Patch-Clamp Vergleich der Stromdichte von TRPM7 *in vitro* differenzierte und FACS sortierte T<sub>H</sub>1 (rot, n=4) und T<sub>H</sub>17-Zellen (blau, n=5).** 0 mM  $Mg^{2+}$  Pipettenlösung, externe Lösung mit 2 mM  $Mg^{2+}$ . A) Representative Stromspannungskurve über 500 s mit Applikation von bivalentfreier Lösung (DVF-300 s bis 400 s). B) Stromspannungskurve bei 300 s vor der Applikation von bivalentfreier Lösung, aus einem repräsentativen Experiment; C) Vergleich der mittleren Stromdichte  $\pm$  Standardfehler bei 400 s, während der Applikation von bivalentfreier Lösung D) Stromspannungskurve bei 400 s während der Applikation von bivalentfreier Lösung, aus einem repräsentativen Experiment. .... 56

**Abbildung 19 Ganzzell-Patch-Clamp Analyse von Strömen mit 0 mM  $Mg^{2+}$  Pipettenlösung und bivalentfreier externer Lösung.** T<sub>H</sub>1 (rot, n=4), T<sub>H</sub>17 (blau, n=5) A) Stromspannungskurven bei 400 s während der Applikation von bivalentfreier Lösung, aus

jeweils einem repräsentativen Experiment. **B)** Vergleich der negativen TRPM7 Einwärtsströme bei 400s während der Applikation von bivalentfreier Lösung. **C)** Anzahl der TRPM7 Kanäle pro Zelle..... 57

**Abbildung 20 Ganzzell-Patch-Clamp Analyse von Strömen mit 0 mM Mg<sup>2+</sup> Pipettenlösung und bivalentfreier externer Lösung.** T<sub>naïve</sub> (schwarz, n=5), T<sub>H1</sub> (rot, n=4), T<sub>H17</sub> (blau, n=5), nT<sub>reg</sub> (grün, n=6) **A)** Stromspannungskurven bei 400s während der Applikation von bivalentfreier Lösung, aus jeweils einem repräsentativen Experiment. **B)** Vergleich der negativen TRPM7 Einwärtsströme (in pA) bei 400s während der Applikation von bivalentfreier Lösung. **C)** Errechnete Anzahl der TRPM7 Kanäle pro Zelle. Anova-Test \*\*p<0,01..... 60

## 6 Literaturverzeichnis

1. Venkatachalam, K. and C. Montell, *TRP channels*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 387-417.
2. Clapham, D.E., *TRP channels as cellular sensors*. Nature, 2003. **426**(6966): p. 517-24.
3. Julia F. Doerner, D.E.C. *Transient Receptor Potential channels, introduction*. . IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY 2018; Available from: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyIntroductionForward?familyId=78>.
4. Launay, P., et al., *TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation*. Science, 2004. **306**(5700): p. 1374-7.
5. Andersen, H.H., et al., *A review of topical high-concentration L-menthol as a translational model of cold allodynia and hyperalgesia*. Eur J Pain, 2013.
6. Zierler, S., S. Hampe, and W. Nadolni, *TRPM channels as potential therapeutic targets against pro-inflammatory diseases*. Cell Calcium, 2017.
7. Ryazanova, L.V., et al., *TRPM7 is essential for Mg(2+) homeostasis in mammals*. Nat Commun, 2010. **1**: p. 109.
8. Runnels, L.W., L. Yue, and D.E. Clapham, *TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities*. Science, 2001. **291**(5506): p. 1043-7.
9. Brandao, K., et al., *The role of Mg2+ in immune cells*. Immunol Res, 2013. **55**(1-3): p. 261-9.
10. Perraud, A.L., et al., *ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 595-9.
11. Schlingmann, K.P., et al., *Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family*. Nat Genet, 2002. **31**(2): p. 166-70.
12. Walder, R.Y., et al., *Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia*. Nat Genet, 2002. **31**(2): p. 171-4.
13. Chubanov, V., et al., *Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2894-9.
14. Winn, M.P., et al., *A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis*. Science, 2005. **308**(5729): p. 1801-4.
15. Reiser, J., et al., *TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function*. Nat Genet, 2005. **37**(7): p. 739-44.
16. Sun, M., et al., *Mucopolipidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(17): p. 2471-8.
17. Bassi, M.T., et al., *Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucopolipidin-and identification of the two major founder mutations causing mucopolipidosis type IV*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(5): p. 1110-20.
18. Mochizuki, T., et al., *PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein*. Science, 1996. **272**(5266): p. 1339-42.
19. Bargal, R., et al., *Identification of the gene causing mucopolipidosis type IV*. Nat Genet, 2000. **26**(1): p. 118-23.
20. Ryazanov, A.G., *Elongation factor-2 kinase and its newly discovered relatives*. FEBS Lett, 2002. **514**(1): p. 26-9.
21. Perraud, A.L., H.M. Knowles, and C. Schmitz, *Novel aspects of signaling and ion-homeostasis regulation in immunocytes. The TRPM ion channels and their potential role in modulating the immune response*. Mol Immunol, 2004. **41**(6-7): p. 657-73.
22. Schmitz, C., et al., *Regulation of vertebrate cellular Mg2+ homeostasis by TRPM7*. Cell, 2003. **114**(2): p. 191-200.

23. Nadler, M.J., et al., *LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 590-5.
24. Montell, C., L. Birnbaumer, and V. Flockerzi, *The TRP channels, a remarkably functional family*. Cell, 2002. **108**(5): p. 595-8.
25. Clapham, D.E., et al., *International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 427-50.
26. Fonfria, E., et al., *Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family*. J Recept Signal Transduct Res, 2006. **26**(3): p. 159-78.
27. Nadolni, W. and S. Zierler, *The Channel-Kinase TRPM7 as Novel Regulator of Immune System Homeostasis*. Cells, 2018. **7**(8).
28. Feske, S., E.Y. Skolnik, and M. Prakriya, *Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(7): p. 532-47.
29. Matsushita, M., et al., *Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20793-803.
30. Monteilh-Zoller, M.K., et al., *TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions*. J Gen Physiol, 2003. **121**(1): p. 49-60.
31. Kerschbaum, H.H. and M.D. Cahalan, *Single-channel recording of a store-operated Ca<sup>2+</sup> channel in Jurkat T lymphocytes*. Science, 1999. **283**(5403): p. 836-9.
32. Aarts, M., et al., *A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death*. Cell, 2003. **115**(7): p. 863-77.
33. Kim, B.J., et al., *Identification of TRPM7 channels in human intestinal interstitial cells of Cajal*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(46): p. 5799-804.
34. Gwanyanya, A., et al., *Magnesium-inhibited, TRPM6/7-like channel in cardiac myocytes: permeation of divalent cations and pH-mediated regulation*. J Physiol, 2004. **559**(Pt 3): p. 761-76.
35. Kerschbaum, H.H., J.A. Kozak, and M.D. Cahalan, *Polyvalent cations as permeant probes of MIC and TRPM7 pores*. Biophys J, 2003. **84**(4): p. 2293-305.
36. Li, M., J. Jiang, and L. Yue, *Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7*. J Gen Physiol, 2006. **127**(5): p. 525-37.
37. Dorovkov, M.V. and A.G. Ryazanov, *Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 50643-6.
38. Clark, K., et al., *The alpha-kinases TRPM6 and TRPM7, but not eEF-2 kinase, phosphorylate the assembly domain of myosin IIA, IIB and IIC*. FEBS Lett, 2008. **582**(20): p. 2993-7.
39. Klein, A.H., et al., *Thermosensitive transient receptor potential (TRP) channel agonists and their role in mechanical, thermal and nociceptive sensations as assessed using animal models*. Chemosens Percept, 2015. **8**(2): p. 96-108.
40. Sahni, J. and A.M. Scharenberg, *TRPM7 ion channels are required for sustained phosphoinositide 3-kinase signaling in lymphocytes*. Cell Metab, 2008. **8**(1): p. 84-93.
41. Kuras, Z., et al., *KCa3.1 and TRPM7 channels at the uropod regulate migration of activated human T cells*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43859.
42. Yee, N.S., A.A. Kazi, and R.K. Yee, *Cellular and Developmental Biology of TRPM7 Channel-Kinase: Implicated Roles in Cancer*. Cells, 2014. **3**(3): p. 751-77.
43. Gautier, M., et al., *Recent Advances in Oncogenic Roles of the TRPM7 Chanzyme*. Curr Med Chem, 2016. **23**(36): p. 4092-4107.
44. Yee, N.S., et al., *TRPM7 and TRPM8 Ion Channels in Pancreatic Adenocarcinoma: Potential Roles as Cancer Biomarkers and Targets*. Scientifica (Cairo), 2012. **2012**: p. 415158.

45. Guilbert, A., et al., *Transient receptor potential melastatin 7 is involved in oestrogen receptor-negative metastatic breast cancer cells migration through its kinase domain*. Eur J Cancer, 2013. **49**(17): p. 3694-707.
46. Kim, B.J., et al., *The role of transient receptor potential channel blockers in human gastric cancer cell viability*. Can J Physiol Pharmacol, 2012. **90**(2): p. 175-86.
47. Linehan, D.C. and P.S. Goedegebuure, *CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer*. Immunol Res, 2005. **32**(1-3): p. 155-68.
48. Guilbert, A., et al., *Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **297**(3): p. C493-502.
49. Kim, B.J., et al., *The role of waixenicin A as transient receptor potential melastatin 7 blocker*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2013. **112**(2): p. 83-9.
50. Yee, N.S., W. Zhou, and I.C. Liang, *Transient receptor potential ion channel Trpm7 regulates exocrine pancreatic epithelial proliferation by Mg<sup>2+</sup>-sensitive Socs3a signaling in development and cancer*. Dis Model Mech, 2011. **4**(2): p. 240-54.
51. Middelbeek, J., et al., *TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis*. Cancer Res, 2012. **72**(16): p. 4250-61.
52. Middelbeek, J., et al., *TRPM7 maintains progenitor-like features of neuroblastoma cells: implications for metastasis formation*. Oncotarget, 2015. **6**(11): p. 8760-76.
53. Yee, N.S., et al., *Aberrant over-expression of TRPM7 ion channels in pancreatic cancer: required for cancer cell invasion and implicated in tumor growth and metastasis*. Biol Open, 2015. **4**(4): p. 507-14.
54. Demeuse, P., R. Penner, and A. Fleig, *TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domain*. J Gen Physiol, 2006. **127**(4): p. 421-34.
55. Penner, R. and A. Fleig, *The Mg<sup>2+</sup> and Mg(2+)-nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7*. Handb Exp Pharmacol, 2007(179): p. 313-28.
56. Chubanov, V., et al., *Natural and Synthetic Modulators of the TRPM7 Channel*. Cells, 2014. **3**(4): p. 1089-101.
57. Runnels, L.W., L. Yue, and D.E. Clapham, *The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(5): p. 329-36.
58. Jiang, J., M. Li, and L. Yue, *Potentialiation of TRPM7 inward currents by protons*. J Gen Physiol, 2005. **126**(2): p. 137-50.
59. Oancea, E., J.T. Wolfe, and D.E. Clapham, *Functional TRPM7 channels accumulate at the plasma membrane in response to fluid flow*. Circ Res, 2006. **98**(2): p. 245-53.
60. Desai, B.N., et al., *Cleavage of TRPM7 releases the kinase domain from the ion channel and regulates its participation in Fas-induced apoptosis*. Dev Cell, 2012. **22**(6): p. 1149-62.
61. Deason-Towne, F., A.L. Perraud, and C. Schmitz, *The Mg<sup>2+</sup> transporter MagT1 partially rescues cell growth and Mg<sup>2+</sup> uptake in cells lacking the channel-kinase TRPM7*. FEBS Lett, 2011. **585**(14): p. 2275-8.
62. Jin, J., et al., *Deletion of Trpm7 disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg<sup>2+</sup> homeostasis*. Science, 2008. **322**(5902): p. 756-60.
63. Li, F.Y., et al., *Second messenger role for Mg<sup>2+</sup> revealed by human T-cell immunodeficiency*. Nature, 2011. **475**(7357): p. 471-6.
64. Chubanov, V., et al., *Epithelial magnesium transport by TRPM6 is essential for prenatal development and adult survival*. Elife, 2016. **5**.
65. Lambers, H., et al., *Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora*. Int J Cosmet Sci, 2006. **28**(5): p. 359-70.
66. Di Meglio, P., G.K. Perera, and F.O. Nestle, *The multitasking organ: recent insights into skin immune function*. Immunity, 2011. **35**(6): p. 857-69.
67. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.

68. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
69. Dunkelberger, J.R. and W.C. Song, *Complement and its role in innate and adaptive immune responses*. Cell Res, 2010. **20**(1): p. 34-50.
70. Noris, M. and G. Remuzzi, *Overview of complement activation and regulation*. Semin Nephrol, 2013. **33**(6): p. 479-92.
71. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
72. Murphy, K.M., *Janeway's immunobiology*. 2011: Garland Science.
73. Sprent, J., *Proving negative selection in the thymus*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 3841-2.
74. O'Shea, J.J. and W.E. Paul, *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells*. Science, 2010. **327**(5969): p. 1098-102.
75. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2076-82.
76. Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer, *T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 247-58.
77. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
78. Romagnani, S., *The Th1/Th2 paradigm*. Immunol Today, 1997. **18**(6): p. 263-6.
79. Singh, S.P., et al., *Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 214-21.
80. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
81. Agarwal, A., et al., *Regulatory T cell-derived exosomes: possible therapeutic and diagnostic tools in transplantation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 555.
82. Singer, B.D., L.S. King, and F.R. D'Alessio, *Regulatory T cells as immunotherapy*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 46.
83. Bluestone, J.A. and Q. Tang, *How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity?* Curr Opin Immunol, 2005. **17**(6): p. 638-42.
84. Scott-Browne, J.P., et al., *Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis*. J Exp Med, 2007. **204**(9): p. 2159-69.
85. Turk, M.J., et al., *Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 771-82.
86. Zhu, X.W., et al., *Foxp3 expression in CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells promotes development of colorectal cancer by inhibiting tumor immunity*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2016. **36**(5): p. 677-682.
87. Josefowicz, S.Z., L.F. Lu, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 531-64.
88. Bluestone, J.A. and A.K. Abbas, *Natural versus adaptive regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 253-7.
89. Lowenstein, F.W. and M.F. Stanton, *Serum magnesium levels in the United States, 1971-1974*. J Am Coll Nutr, 1986. **5**(4): p. 399-414.
90. Ebel, H. and T. Gunther, *Magnesium metabolism: a review*. J Clin Chem Clin Biochem, 1980. **18**(5): p. 257-70.
91. Goytain, A. and G.A. Quamme, *Functional characterization of human SLC41A1, a Mg2+ transporter with similarity to prokaryotic MgtE Mg2+ transporters*. Physiol Genomics, 2005. **21**(3): p. 337-42.
92. Hurd, T.W., et al., *Mutation of the Mg2+ transporter SLC41A1 results in a nephronophthisis-like phenotype*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(6): p. 967-77.

93. Kolisek, M., et al., *SLC41A1 is a novel mammalian Mg<sup>2+</sup> carrier*. J Biol Chem, 2008. **283**(23): p. 16235-47.
94. Kolisek, M., et al., *Human gene SLC41A1 encodes for the Na<sup>+</sup>/Mg(2)<sup>+</sup> exchanger*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(1): p. C318-26.
95. Sahni, J., B. Nelson, and A.M. Scharenberg, *SLC41A2 encodes a plasma-membrane Mg<sup>2+</sup> transporter*. Biochem J, 2007. **401**(2): p. 505-13.
96. Wang, C.Y., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel gene family of four ancient conserved domain proteins (ACDP)*. Gene, 2003. **306**: p. 37-44.
97. Piskacek, M., et al., *Conditional knockdown of hMRS2 results in loss of mitochondrial Mg(2<sup>+</sup>) uptake and cell death*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(4): p. 693-700.
98. Alderton, A., et al., *Ancient conserved domain protein-1 binds copper and modifies its retention in cells*. J Neurochem, 2007. **103**(1): p. 312-21.
99. Goytain, A. and G.A. Quamme, *Functional characterization of ACDP2 (ancient conserved domain protein), a divalent metal transporter*. Physiol Genomics, 2005. **22**(3): p. 382-9.
100. Stuiver, M., et al., *CNNM2, encoding a basolateral protein required for renal Mg<sup>2+</sup> handling, is mutated in dominant hypomagnesemia*. Am J Hum Genet, 2011. **88**(3): p. 333-43.
101. Parry, D.A., et al., *Mutations in CNNM4 cause Jalili syndrome, consisting of autosomal-recessive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta*. Am J Hum Genet, 2009. **84**(2): p. 266-73.
102. Polok, B., et al., *Mutations in CNNM4 cause recessive cone-rod dystrophy with amelogenesis imperfecta*. Am J Hum Genet, 2009. **84**(2): p. 259-65.
103. Yamazaki, D., et al., *Basolateral Mg<sup>2+</sup> extrusion via CNNM4 mediates transcellular Mg<sup>2+</sup> transport across epithelia: a mouse model*. PLoS Genet, 2013. **9**(12): p. e1003983.
104. de Baaij, J.H.F., J.G.J. Hoenderop, and R.J.M. Bindels, *Magnesium in Man: Implications for Health and Disease*. Vol. 95. 2015. 1-46.
105. Mazur, A., et al., *Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications*. Arch Biochem Biophys, 2007. **458**(1): p. 48-56.
106. Zimowska, W., et al., *Morphological and immune response alterations in the intestinal mucosa of the mouse after short periods on a low-magnesium diet*. Br J Nutr, 2002. **88**(5): p. 515-22.
107. Malpuech-Brugere, C., et al., *Accelerated thymus involution in magnesium-deficient rats is related to enhanced apoptosis and sensitivity to oxidative stress*. Br J Nutr, 1999. **81**(5): p. 405-11.
108. Shalev, H., et al., *Clinical presentation and outcome in primary familial hypomagnesaemia*. Arch Dis Child, 1998. **78**(2): p. 127-30.
109. Grubbs, R.D. and M.E. Maguire, *Magnesium as a regulatory cation: criteria and evaluation*. Magnesium, 1987. **6**(3): p. 113-27.
110. Murphy, E., *Mysteries of magnesium homeostasis*. Circ Res, 2000. **86**(3): p. 245-8.
111. Permyakov, E.A. and R.H. Kretsinger, *Cell signaling, beyond cytosolic calcium in eukaryotes*. J Inorg Biochem, 2009. **103**(1): p. 77-86.
112. Takaya, J., H. Higashino, and Y. Kobayashi, *Can magnesium act as a second messenger? Current data on translocation induced by various biologically active substances*. Magnes Res, 2000. **13**(2): p. 139-46.
113. Schenk, U., et al., *ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors*. Sci Signal, 2011. **4**(162): p. ra12.
114. Paravicini, T.M., et al., *Dysregulation of vascular TRPM7 and annexin-1 is associated with endothelial dysfunction in inherited hypomagnesemia*. Hypertension, 2009. **53**(2): p. 423-9.

115. Chubanov, V., et al., *Natural and synthetic modulators of SK (K<sub>ca</sub>)<sub>2</sub> potassium channels inhibit magnesium-dependent activity of the kinase-coupled cation channel TRPM7*. Br J Pharmacol, 2012. **166**(4): p. 1357-76.
116. Zierler, S., et al., *Waixenicin A inhibits cell proliferation through magnesium-dependent block of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels*. J Biol Chem, 2011. **286**(45): p. 39328-35.
117. Kozak, J.A., et al., *Charge screening by internal pH and polyvalent cations as a mechanism for activation, inhibition, and rundown of TRPM7/MIC channels*. J Gen Physiol, 2005. **126**(5): p. 499-514.
118. Tani, D., et al., *Cell cycle-dependent regulation of store-operated I(CRAC) and Mg<sup>2+</sup>-nucleotide-regulated MagNum (TRPM7) currents*. Cell Calcium, 2007. **41**(3): p. 249-60.
119. Gwanyanya, A., et al., *ATP and PIP2 dependence of the magnesium-inhibited, TRPM7-like cation channel in cardiac myocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(4): p. C627-35.
120. Jiang, X., E.W. Newell, and L.C. Schlichter, *Regulation of a TRPM7-like current in rat brain microglia*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 42867-76.
121. Lewis, R.S., *Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 497-521.
122. Badou, A., et al., *Emerging roles of L-type voltage-gated and other calcium channels in T lymphocytes*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 243.
123. Cahalan, M.D. and K.G. Chandy, *The functional network of ion channels in T lymphocytes*. Immunol Rev, 2009. **231**(1): p. 59-87.
124. Schwarz, E.C., et al., *TRP channels in lymphocytes*. Handb Exp Pharmacol, 2007(179): p. 445-56.
125. Romagnani, A., et al., *TRPM7 kinase activity is essential for T cell colonization and alloreactivity in the gut*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1917.
126. Krishnamoorthy, M., et al., *The channel-kinase TRPM7 regulates antigen gathering and internalization in B cells*. Sci Signal, 2018. **11**(533).
127. Beesetty, P., et al., *Inactivation of TRPM7 kinase in mice results in enlarged spleens, reduced T-cell proliferation and diminished store-operated calcium entry*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 3023.
128. Sahni, J., et al., *TRPM7 regulates quiescent/proliferative metabolic transitions in lymphocytes*. Cell Cycle, 2010. **9**(17): p. 3565-74.
129. Suvas, S., et al., *CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells regulate virus-specific primary and memory CD8<sup>+</sup> T cell responses*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 889-901.
130. Cabrera, R., et al., *An immunomodulatory role for CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection*. Hepatology, 2004. **40**(5): p. 1062-71.
131. Dittmer, U., et al., *Functional impairment of CD8<sup>(+)</sup> T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection*. Immunity, 2004. **20**(3): p. 293-303.

# Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Thomas Gudermann für die Aufnahme in sein Institut, die fortwährende Unterstützung und freundliche Betreuung.

Frau PD Dr. rer. nat. Susanna Zierler danke ich von ganzem Herzen für die ansteckende Begeisterung für die Forschung, die warmherzige Betreuung und die unendliche Geduld.

Ich möchte mich ganz herzlich bei dem ganzen Team der AG-Zierler bedanken, ohne das diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bedanken möchte ich mich auch bei unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Schulze-Koops, seiner Arbeitsgruppe sowie den Probanden.

Ich danke meiner fabelhaften Familie für ihre Unterstützung aus der Ferne und das stoische Ertragen.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Freunden und Peter Labatzke für die herzliche Unterstützung nach langen Labortagen und eine großartige Studienzeit.

# Eidesstattliche Versicherung

Lewitz, Dorothea

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

## **Erhöhte Differenzierung von humanen regulatorischen T-Zellen durch Blockade des Melastatin-ähnlichen Transienten Rezeptor Potential Kationen Kanal 7 (TRPM7)**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Hamburg, den 24. April 2021

Dorothea Lewitz

Ort, Datum

Dorothea Lewitz