

**Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie**

**Institut der**

**Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann



## **Die Rolle der TRPM7-Kinase im Mausmodell der Multiplen Sklerose**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Katharina Susanne Jacob

aus München

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Betreuerin: Prof. Dr. Susanna Zierler

Zweitgutachter: PD Dr. Klaus Dornmair

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.23

**Für meine Familie**

allen voran

**meine Mutter Eva Jacob**

und

**Großeltern Adolf und Gertrude Jacob**

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Zusammenfassung .....</b>                                                            | <b>1</b>  |
| <b>2. Summary .....</b>                                                                    | <b>2</b>  |
| <b>3. Einleitung .....</b>                                                                 | <b>4</b>  |
| <b>3.1 TRP (engl. transient receptor potential) Kanal Familie .....</b>                    | <b>4</b>  |
| <b>3.2 Der Transient-Rezeptor-Potential Kationen Kanal, Unterfamilie M 7 (TRPM7) .....</b> | <b>5</b>  |
| 3.2.1 Pathophysiologische Rolle des TRPM7-Kanals .....                                     | 7         |
| 3.2.2 Pharmakologische Modulatoren des TRPM7-Proteins .....                                | 9         |
| <b>3.3 Das Immunsystem und die Rolle von TRPM7 .....</b>                                   | <b>12</b> |
| 3.3.1 Die Rolle der TRPM7-Kanalkinase im Immunsystem .....                                 | 14        |
| 3.3.1.1 TRPM7 in Mastzellen .....                                                          | 14        |
| 3.3.1.2 TRPM7 in Neutrophilen .....                                                        | 15        |
| 3.3.1.3 TRPM7 in Makrophagen .....                                                         | 16        |
| 3.3.1.4 TRPM7 in Lymphozyten .....                                                         | 17        |
| 3.3.2 TRPM7 in Autoimmun- und pro-entzündlichen Erkrankungen .....                         | 20        |
| <b>3.4 Multiple Sklerose, eine T-Zell vermittelte Autoimmunität .....</b>                  | <b>23</b> |
| 3.4.1 Experimentelle Tiermodelle – Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ..... | 24        |
| <b>3.5 Zielsetzung .....</b>                                                               | <b>26</b> |
| <b>4. Material und Methoden .....</b>                                                      | <b>27</b> |
| <b>4.1 Material .....</b>                                                                  | <b>27</b> |
| 4.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....                                                     | 27        |
| 4.1.2 Puffer und Lösungen .....                                                            | 30        |
| 4.1.3 Kits und Assays .....                                                                | 31        |
| 4.1.4 Zellkultur Media und Supplements .....                                               | 32        |
| 4.1.5 Zytokine .....                                                                       | 32        |
| 4.1.6 Primer .....                                                                         | 33        |
| 4.1.7 Antikörper und Isotypen Kontrolle .....                                              | 33        |
| 4.1.9 Haltungsbedingungen der Versuchstiere .....                                          | 35        |
| 4.1.10 Mauslinien .....                                                                    | 35        |
| 4.1.11 Geräte und Laborausstattung .....                                                   | 36        |
| 4.1.12 Verbrauchsmaterialien .....                                                         | 37        |
| 4.1.13 Software .....                                                                      | 40        |
| <b>4.2 Methoden .....</b>                                                                  | <b>41</b> |
| 4.2.1 Zellkultur .....                                                                     | 41        |
| 4.2.1.1 Jurkat Zelllinie .....                                                             | 41        |
| 4.2.1.2 Primäre Lymphozyten (Maus) .....                                                   | 41        |
| 4.2.1.3 Zellzahl-Bestimmung mittels Neubauerkammer .....                                   | 41        |
| 4.2.2 Mäusezucht der genmodifizierten Mäuse .....                                          | 41        |
| 4.2.2.1 Genotypisierung Maus .....                                                         | 42        |
| 4.2.4 Organentnahme und Zellisolation .....                                                | 44        |
| 4.2.4.1 Lymphknoten .....                                                                  | 44        |
| 4.2.4.2 Milz .....                                                                         | 44        |
| 4.2.4.3 Zentrales Nervensystem (ZNS) .....                                                 | 45        |
| 4.2.5 EAE- Experimentelle- autoimmune-Enzephalomyelitis .....                              | 46        |
| 4.2.5.1 aktive EAE .....                                                                   | 48        |
| 4.2.5.2 passive EAE .....                                                                  | 49        |
| 4.2.6 Fluoreszenzfärbung und Messung mittels Durchflusszytometrie .....                    | 50        |
| 4.2.6.1 Zellstimulation für Zytokinfärbungen .....                                         | 50        |
| 4.2.6.2 Fluoreszenzfärbung zur Messung am Durchflusszytometer .....                        | 50        |
| 4.2.7 Transkriptomanalyse T <sub>H</sub> 17 differenzierter Zellen .....                   | 51        |



|                                                                                                                                                                      |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2.7.1 T <sub>H</sub> 17 Differenzierung unter verschiedenen Bedingungen .....                                                                                      | 51         |
| 4.2.7.2 Auswertung mittels TAC-Software .....                                                                                                                        | 52         |
| 4.2.8 Gewinnung von Liquor aus Patienten mit Multiplen Sklerose .....                                                                                                | 53         |
| 4.2.8.1 Zellisolation aus Cerebrospinalflüssigkeit.....                                                                                                              | 53         |
| 4.2.8.2 PBMC-(Peripher mononukleare Blutzellen) Isolation aus Blut .....                                                                                             | 53         |
| 4.2.9 Elektrophysiologie-Patch Clamp.....                                                                                                                            | 53         |
| 4.2.9.1 Beschichtung der Glasdeckgläser .....                                                                                                                        | 55         |
| 4.2.9.2 Messung von Jurkat Zellen, inkubiert in Pertussis Toxin .....                                                                                                | 55         |
| 4.2.10 Datenauswertung und statistische Analyse .....                                                                                                                | 56         |
| <b>5. Ergebnisse .....</b>                                                                                                                                           | <b>56</b>  |
| <b>5.1 Die TRPM7-Kinasefunktion in der aktiven experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis der Maus .....</b>                                                      | <b>56</b>  |
| 5.1.1 Vergleich von Leukozyten Populationen in unstimulierten <i>Trpm7<sup>+/+</sup></i> und <i>Trpm7<sup>R/R</sup></i> Mäusen <i>ex vivo</i> ..                     | 57         |
| 5.1.2 Überprüfung des Einflusses des Pertussis Toxins auf die TRPM7-Kanalfunktion.....                                                                               | 58         |
| 5.1.3 Vergleich zwischen <i>Trpm7<sup>+/+</sup></i> und <i>Trpm7<sup>R/R</sup></i> Mäusen bei der aktiven EAE <i>in vivo</i> .....                                   | 60         |
| 5.1.4 Vergleich zwischen <i>Trpm7<sup>+/+</sup></i> und <i>Trpm7<sup>R/R</sup></i> Mäusen bei der aktiven EAE <i>ex vivo</i> .....                                   | 61         |
| <b>5.2 Die TRPM7-Kinasefunktion in der passiven experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis der Maus .....</b>                                                     | <b>63</b>  |
| 5.2.1 Vergleich zwischen <i>Trpm7<sup>+/+</sup></i> und <i>Trpm7<sup>R/R</sup></i> Mäusen bei der passiven EAE <i>in vivo</i> .....                                  | 64         |
| 5.2.2 Vergleich zwischen erkrankten <i>Trpm7<sup>+/+</sup></i> und <i>Trpm7<sup>R/R</sup></i> Mäusen bei der passiven EAE <i>ex vivo</i> .....                       | 65         |
| 5.2.3 Vergleich zwischen nicht erkrankten <i>Trpm7<sup>+/+</sup></i> und <i>Trpm7<sup>R/R</sup></i> Mäusen bei der passiven EAE <i>ex vivo</i> .                     | 67         |
| <b>5.3 Differenzierungs- und Transkriptomanalyse von T<sub>H</sub>17 Populationen in <i>Trpm7<sup>+/+</sup></i> und <i>Trpm7<sup>R/R</sup></i> Lymphozyten .....</b> | <b>70</b>  |
| 5.3.1 Vergleich der T <sub>H</sub> 17-Zelldifferenzierung von <i>Trpm7<sup>+/+</sup></i> und <i>Trpm7<sup>R/R</sup></i> unter verschiedenen Bedingungen .....        | 70         |
| 5.3.2 Cluster Analyse der Genexpression unter den verschiedenen Differenzierungs-bedingungen .....                                                                   | 71         |
| 5.3.3 Transkriptomanalyse der T <sub>H</sub> 17 Zellpopulationen von <i>Trpm7<sup>+/+</sup></i> versus <i>Trpm7<sup>R/R</sup></i> .....                              | 73         |
| <b>5.4 TRPM7-Strom-Messung von Patienten mit akuter MS .....</b>                                                                                                     | <b>77</b>  |
| 5.4.1 Patch-Clamp Daten aus Liquor Zellen sowie entsprechender T-Zellen aus dem Blut .....                                                                           | 77         |
| <b>6. Diskussion.....</b>                                                                                                                                            | <b>80</b>  |
| 6.1 TRPM7-Kinase im ZNS gesunder Tiere .....                                                                                                                         | 80         |
| 6.2 TRPM7-Kinase in der aktiven EAE .....                                                                                                                            | 81         |
| 6.3 IL-1 $\beta$ Stimulation überlagert die anti-inflammatorischen Effekte der <i>Trpm7<sup>R/R</sup></i> .....                                                      | 82         |
| 6.4. TRPM7-Kinaseinaktivierung führt zu einem mildereren Krankheitsverlauf der passiven EAE .                                                                        | 86         |
| 6.5. TRPM7-Kinaseaktivität reduziert die Chemokinexpression unter T <sub>H</sub> 17 Differenzierungsbedingungen .....                                                | 89         |
| <b>7. Ausblick .....</b>                                                                                                                                             | <b>91</b>  |
| <b>8. Literaturverzeichnis .....</b>                                                                                                                                 | <b>93</b>  |
| <b>I. Abbildungsverzeichnis .....</b>                                                                                                                                | <b>104</b> |
| <b>II. Tabellenverzeichnis.....</b>                                                                                                                                  | <b>105</b> |
| <b>III. Abkürzungsverzeichnis.....</b>                                                                                                                               | <b>106</b> |
| <b>IV. Versicherung an Eides statt .....</b>                                                                                                                         | <b>109</b> |
| <b>V. Danksagung .....</b>                                                                                                                                           | <b>110</b> |

# 1. Zusammenfassung

Der Transiente Rezeptor Potential Kationenkanal, TRPM7, ist ein ubiquitär exprimierter Ionenkanal, mit einer am C-Terminus fusionierten Serin/Threonin Kinase. Die Kanaldomäne leitet bivalente Kationen, vor allem  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ , und ist damit ein wichtiger Bestandteil der Zellhomöostase. Die Funktion der Kinase jedoch, ist im Vergleich weit weniger gut erforscht. Jüngste Forschung konnte zeigen, dass die Kinaseaktivität die Graft-versus-host-Disease, GvHD, bei Stammzelltransplantationen fördert. Die Inaktivierung der Kinase führte zu einer verringerten Differenzierung in pro-entzündliche  $\text{T}_\text{H}17$  Zellen und verhinderte damit die pro-entzündliche Reaktion ausgehend von den transplantierten Zellen. Bei anderen pro-entzündlichen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose (MS) sind  $\text{T}_\text{H}17$  Zellen ebenfalls maßgeblich an der Entstehung der Krankheit beteiligt. MS ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die das zentrale Nervensystem betrifft, und durch die fortschreitende Erkrankung durch den Verlust der Myelinscheiden der Nervenzellen gekennzeichnet ist.

In dieser Doktorarbeit wurde anhand des Tiermodells für MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) untersucht, ob und inwiefern die TRPM7-Kinase eine Rolle in der Entwicklung und dem Voranschreiten der Erkrankung spielt. Hierfür verwendeten wir ein bereits etabliertes Mausmodell mit einer Punktmutation an der aktiven Stelle der TRPM7-Kinase, K1646R (*Trpm7<sup>R/R</sup>*). Bei aktiver EAE zeigte sich, dass eine Immunisierung mit Pertussis Toxin den IL-1 $\beta$  Signalweg stark stimulierte. Dadurch wurde der anti-inflammatorische Einfluss der *Trpm7<sup>R/R</sup>* überlagert und die Tiere wurden ungeachtet des Genotyps gleichermaßen krank. Bestätigt werden diese Beobachtungen auch durch die *in vitro* Differenzierungen von *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* in  $\text{T}_\text{H}17$  Zellen, die je mit oder ohne IL-1 $\beta$  durchgeführt wurden. *Trpm7<sup>R/R</sup>* Zellen lassen sich mit IL-1 $\beta$  ähnlich gut in  $\text{T}_\text{H}17$  Zellen differenzieren wie *Trpm7<sup>+/+</sup>* Zellen. Dabei differenzieren *Trpm7<sup>+/+</sup>* unabhängig von IL-1 $\beta$  gleichermaßen gut in  $\text{T}_\text{H}17$  Zellen. Ohne die Zugabe von IL-1 $\beta$ , differenzieren *Trpm7<sup>R/R</sup>* Zellen signifikant schlechter in  $\text{T}_\text{H}17$  Zellen.

Wird nun der starke Stimulus des IL-1 $\beta$  Signalwegs vermieden, indem die EAE mittels passiver Immunisierung ausgelöst wird, konnten wir zeigen, dass der Verlust der Kinaseaktivität zu einer geringeren Inzidenz führte. Es erkrankten im Vergleich zu den *Trpm7<sup>+/+</sup>* Mäusen, signifikant weniger Tiere. Bei den *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tieren, die erkrankten, war der Krankheitsverlauf

milder als bei den *Trpm7<sup>+/+</sup>* Tieren, sie verloren weniger an Gewicht und entwickelten keine Symptome im oberen Score-Bereich.

Außerdem konnten wir zeigen, dass eine vermehrte Migration von T<sub>reg</sub> Zellen in das ZNS der erkrankten *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tiere stattfand, was mit einer guten Prognose für die Remyelinisierung der geschädigten Nervenfasern assoziiert ist. Darüber hinaus waren keine T<sub>H</sub>17 Zellen in das ZNS der nicht erkrankten *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tiere eingewandert, wohl aber in das ZNS der nicht erkrankten *Trpm7<sup>+/+</sup>* Tiere. Die Aktivität der Kinase hat außerdem Einfluss auf die Chemokin Expression der T-Lymphozyten. *Trpm7<sup>R/R</sup>* T-Zellen, die ohne den Zusatz von IL-1 $\beta$  differenziert wurden, exprimieren signifikant mehr *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl9* sowie *Cxcr1* und vermeiden die Herunterregulation des *S1pr1*. Interessantweise ist bekannt, dass *Cxcr1*, *Ccl3*, *Ccl4* und *Ccl5* in Kombination primär für einen pro-inflammatorischen Phänotyp verantwortlich sind. Einzeln betrachtet, gibt es allerdings Hinweise auf ein besonderes Rekrutierungspotential von T<sub>reg</sub> Zellen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die zusätzliche Kombination mit *Ccl9* und *S1pr1* zu einem anti-entzündlichen Signal führt, das eine verstärkte Migration von T<sub>reg</sub> Zellen zur Folge hat, und folglich weniger Tiere erkranken. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inaktivierung der Kinaseaktivität ein vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Behandlung von Multipler Sklerose ist, und es weiterer Forschung bedarf um die genauen Prozesse und Signalwege dahinter zu klären.

## 2. Summary

The transient receptor potential channel subfamily M member 7, is a ubiquitously expressed cation channel with a c-terminal fused serine/threonine kinase. It has been associated with a numerous of important cellular functions like proliferation, differentiation, activation and survival. In addition, it strongly linked to immunity and seems to be an important signaling molecule in lymphocytes. Recently it has been shown that the TRPM7 kinase activity promotes Graft *versus* Host Disease in Mice. In the GvHD, T-helper 17 (T<sub>H</sub>17) cells differentiated from the transplanted donor cells act against the host in a pro-inflammatory manner. In other pro-inflammatory diseases such as Multiple Sclerosis (MS), T<sub>H</sub>17 cells are also significantly involved in the development of the disease. MS is a chronic autoimmune disease affecting the central nervous system and is characterized by progressive disease with loss of the myelin sheath of nerve cells.

In this thesis, using an animal model of MS, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), we evaluated whether and to what extent the TRPM7 kinase plays a role in the development and progression of MS. Therefore, we utilized an established mouse model with a point mutation at the active site of the kinase, K1646R (*Trpm7<sup>R/R</sup>*). In active EAE, immunization with pertussis toxin was shown to strongly stimulate the IL-1 $\beta$  signaling pathway. This overrides the anti-inflammatory influence of *Trpm7<sup>R/R</sup>*, animals become equally ill regardless of their genotype. These observations were confirmed by *in vitro* differentiations into T<sub>H</sub>17 cells of *Trpm7<sup>+/+</sup>* and *Trpm7<sup>R/R</sup>* CD4<sup>+</sup> T cells. *Trpm7<sup>R/R</sup>* cells can be differentiated into T<sub>H</sub>17 cells with IL-1 $\beta$  similarly well as *Trpm7<sup>+/+</sup>* cells. *Trpm7<sup>+/+</sup>* cells differentiate equally well into T<sub>H</sub>17 cells independent of IL-1 $\beta$ . Without the addition of IL-1 $\beta$ , significantly fewer *Trpm7<sup>R/R</sup>* cells differentiate into T<sub>H</sub>17 cells.

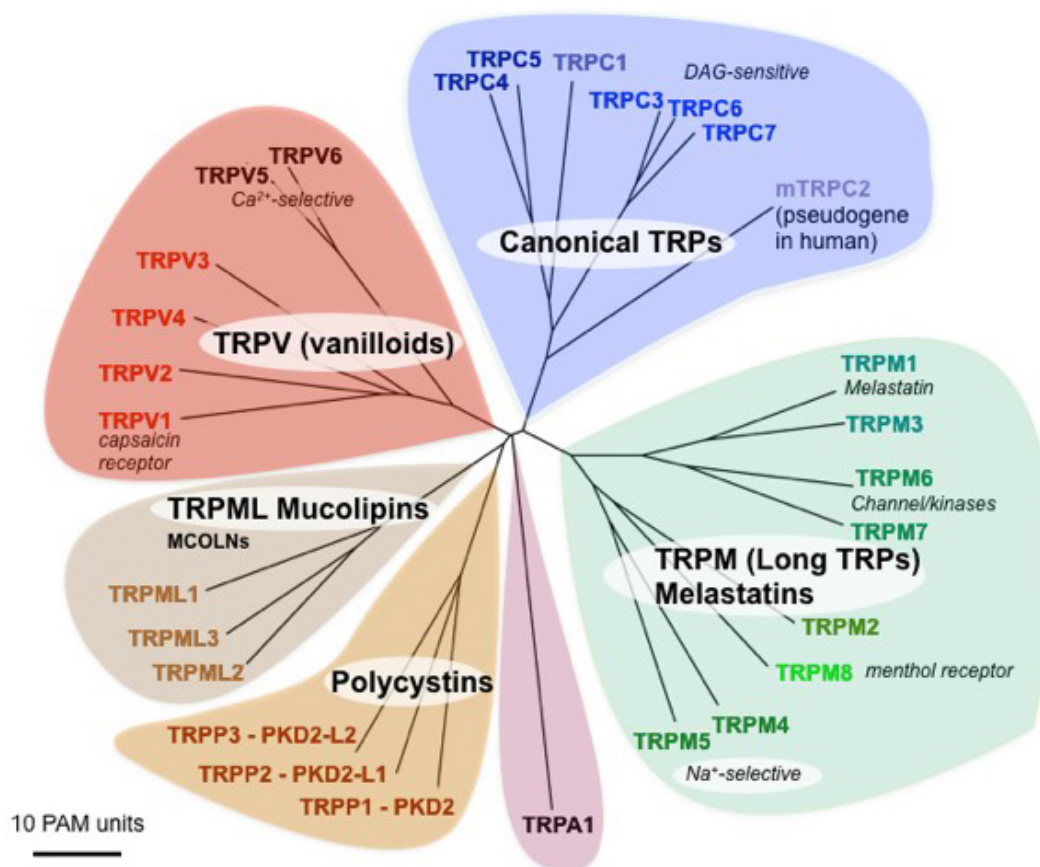
Interestingly, when the strong additional stimulus of the IL-1 $\beta$  pathway is circumvented by inducing EAE via passive immunization, we can show that the loss of kinase activity leads to a lower incidence of EAE. Significantly fewer animals became ill, compared to *Trpm7<sup>+/+</sup>*. In the *Trpm7<sup>R/R</sup>* animals that did become ill, the course of the disease was milder than in their *Trpm7<sup>+/+</sup>* littermates. In addition, we could show that there was an increased migration of T<sub>reg</sub> cells into the CNS of the diseased *Trpm7<sup>R/R</sup>*, which is associated with a good prognosis for remyelination of the damaged nerve fibers. Furthermore, no T<sub>H</sub>17 cells had migrated into the CNS of non-diseased *Trpm7<sup>R/R</sup>*, but they had migrated into the CNS of non-diseased *Trpm7<sup>+/+</sup>*. Moreover, we found that the activity of the kinase also affects chemokine expression by T-lymphocytes. *Trpm7<sup>R/R</sup>* cells that were differentiated without the addition of IL-1 $\beta$  expressed significantly more *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl9*, and *Cxcr1* and avoided downregulation of *S1pr1*. Interestingly, in combination, *Cxcr1*, *Ccl3*, *Ccl4*, and *Ccl5* are known to primarily promote a pro-inflammatory phenotype. Considering individually, however, there is evidence for a particular recruitment potential of T<sub>reg</sub> cells. Our results suggest that the additional combination with *Ccl9* and *S1pr1* leads to an anti-inflammatory signal, which results in an increased migration of T<sub>reg</sub> cells and consequently less animals get sick. In conclusion, the inactivation of kinase activity constitutes a promising therapeutic strategy in the treatment of MS and requires further research to elucidate the exact processes and signaling pathways underlying.

### 3. Einleitung

#### 3.1 TRP (engl. transient receptor potential) Kanal Familie

Erstmals beschrieben wurden TRP Kanäle 1969 in einer spontanen Mutation der *Drosophila* Fliege. Ein Photorezeptor reagierte, anders als im Wildtyp der Fliege, nur transient auf einen Lichtreiz, nicht also für die Dauer des Impulses [1]. Es nahm aber fast zwei Jahrzehnte in Anspruch bevor Montell und Rubin im Jahr 1989 das *trp* Gen identifizierten [2, 3].

Heute sind viele Vertreter der TRP-Kanalfamilie bekannt. Diese TRP-Kanäle sind stark konserviert und finden sich im Genom von unter anderem Hefen, über Fische bis hin zu Menschen [3]. Innerhalb der Säugetiere werden TRP-Kanäle in sechs Unterfamilien unterteilt, die insgesamt 28 Mitglieder zählen (Abb. 1). TRPC (klassische Kanäle), TRPM (Melastatin-Kanäle), TRPA (Ankyrin-Kanal), TRPP (Polycystin-Kanäle), TRPML (Mucolipin-Kanäle) und TRPV (Vanilloid-Rezeptor-Kanäle).



**Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanäle von Säugetieren.** Die Länge der Verzweigung gibt die evolutionäre Distanz in PAM an. Modifiziert von [4]. Abgebildet sind die 6 bekannten Unterfamilien der Säugetiere und dessen Mitglieder.

Alle Kanäle unterscheiden sich in Mechanismus und Funktion, und werden daher über ihre primäre Aminosäuresequenzhomologie klassifiziert und eingeteilt [4, 5].

Die Funktionen variieren nicht nur zwischen den Unterfamilien, sondern auch innerhalb. Es sind TRP-Kanäle bekannt, die beispielweise an der Warm-Kaltdifferenzierung [6-8], der Schmerzreizweiterleitung [7, 9] oder auch der Wahrnehmung der Geschmäcker bitter, süß und umami [4, 10, 11] beteiligt sind, um nur wenige zu nennen. Die große Gemeinsamkeit der TRP-Familie neben der sechs Transmembranregionen, ist die Leitfähigkeit von Kationen [3]. Es wird vermutet dass je vier der Untereinheiten eine Pore formen, die das Zentrum des Kanals bildet [12].

Die TRP Kanäle steuern ein weites Spektrum an physiologischen Aufgaben, welches durch mehr als 20 humane Erberkrankungen veranschaulicht wird, die durch Mutationen in 11 *Trp*-Genen verursacht werden [13, 14].

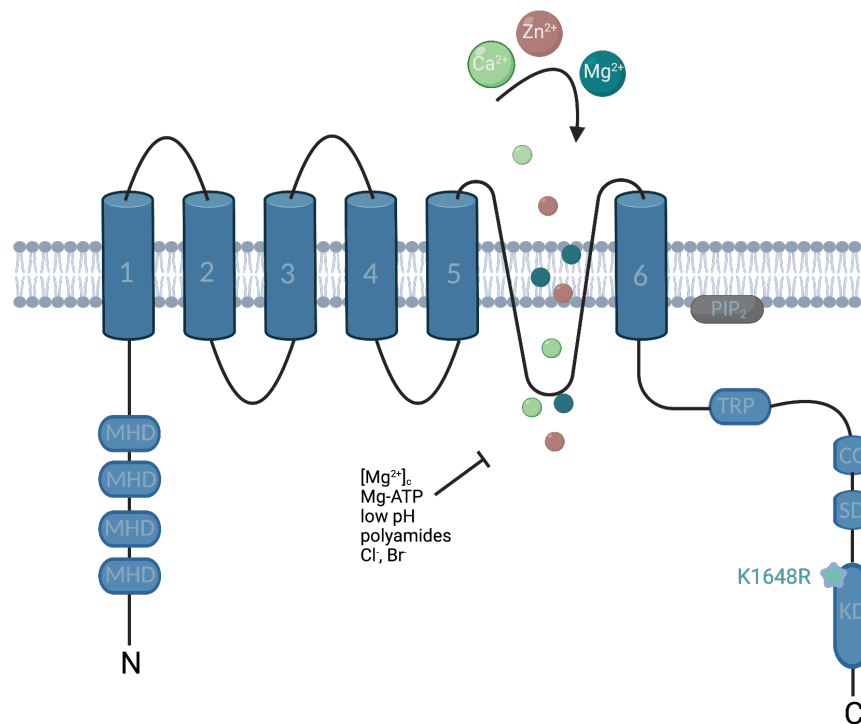
Die meisten Erkrankungen, die mit TRP-Kanälen assoziiert werden, wirken sich auf den Stoffwechsel oder andere homöostatische Abläufe aus. Um aber ein grundlegendes Verständnis der Pathophysiologie dieser Kanäle zu entwickeln, bedarf es weiterer Forschung.

### 3.2 Der Transient-Rezeptor-Potential Kationen Kanal, Unterfamilie M 7 (TRPM7)

In der Unterfamilie der Melastatin-ähnlichen TRP-Kanäle gibt es insgesamt 8 Mitglieder [15, 16]. TRPM7 besitzt 4 Melastatin-Einheiten am N-Terminus (MHD), 6 Transmembrane-Regionen und C-Terminal die hochkonservierte TRP-Region. Eine Besonderheit innerhalb der TRP-Familie stellt aber die C-Terminal fusionierte Serin/Threonin- $\alpha$ -Kinase dar. Eine derartige Doppelfunktion teilt sich TRPM7 nur mit seinem „Schwesterprotein“ TRPM6, wobei die beiden  $\alpha$ -Kinasen nicht redundant zu sein scheinen [4, 16, 17]. Es wurden bereits einige *in vitro*-Substrate der TRPM7-Kinase identifiziert, wie Annexin A1 [18, 19], Myosin-Heavy-Chain II [20] und PLC $\gamma$ 2 [21]. Mit Hilfe neuer Mausmodelle konnte SMAD2 als ein natives Kinasesubstrat identifiziert werden [22, 23].

Durch die Bildung von Tetrameren, entweder homomer oder heteromer mit TRPM6, bildet sich zwischen der Transmembranregion 5 und 6 eine Pore, durch die die Kationen einströmen können [24]. Es wird vermutet, dass der TRPM7-Kanal konstitutiv geöffnet ist, aber die Kanalaktivität durch intrazelluläre Kationen (z.B. Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>), Mg-ATP, Polyamine, Chlorid und Bromid, Protonen und der Hydrolyse des Phospholipids PIP<sub>2</sub> negativ reguliert wird [17,

25-28]. Während nahezu alle TRP-Kanäle leitfähig für  $\text{Ca}^{2+}$  sind, ist die Anzahl der  $\text{Mg}^{2+}$  Durchlässigkeit auf TRPM6 und TRPM7 begrenzt [16, 29]. TRPM7 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, dass mit der folgenden Permeabilitätssequenz  $\text{Zn}^{2+} \approx \text{Ni}^{2+} \gg \text{Ba}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mg}^{2+} \geq \text{Mn}^{2+} \geq \text{Sr}^{2+} \geq \text{Cd}^{2+} \geq \text{Ca}^{2+}$  selektiv für bivalente Kationen ist. Dabei nimmt TRPM7 eine wichtige Rolle in unterschiedlichsten physiologischen Prozessen ein, inklusive der Magnesium-Homöostase innerhalb der Zelle [30, 31].



**Abbildung 2: Topologie der TRPM7-Kanalkinase.** Jedes TRPM7-Protein besteht aus sechs Transmembrane-Regionen (TM) (1-6), wobei sich die Kanalpore zwischen der 5. und 6. TM-Region befindet. Lokalisiert am N-Terminus finden sich die für die TRPM-Unterfamilie charakteristischen 4 Melastatin-Homologe-Domänen (MHD). Am C-Terminus finden sich die Transient-Rezeptor-Potential-Domäne, eine Coiled-Coiled-Domäne (CC), die Kinase-Substratbindestelle (SD) sowie die atypische  $\alpha$ -Typ Serin/Threonin-Proteinkinase Domäne (KD). Eine Mutation an Position K1646R, markiert durch den Stern, in aktiviert die Kinasefunktion ohne die allgemeine Aktivität zu beeinflussen. TRPM7 kann durch physiologische Konzentrationen an freiem zytosolischem Magnesium, Mg-ATP-Polyamine, niedrigen pH-Wert, Chlorid und Bromid sowie einem Mangel an  $\text{PIP}_2$  negativ reguliert werden.

Eine vollständige genetische Deletion des TRPM7 Proteins (*Trpm7*<sup>-/-</sup>) ist in Mäusen embryonal letal [31, 32]. Auch die homozygote Deletion der für die Kinasedomäne kodierenden Exons (*Trpm7* <sup>$\Delta k/\Delta k$</sup> ), führt zu einer frühen embryonalen Sterblichkeit bei Mäusen, während die heterozygoten Tiere lebensfähig sind [31, 32]. An einem später etablierten Mausmodell tragen

die Mäuse eine Punktmutation an der aktiven Stelle der Kinase, K1646R (*Trpm7<sup>R/R</sup>*), welche die katalytische Aktivität der Kinase inaktiviert, die strukturellen Eigenschaften aber weiterstehend unverändert lässt [28, 33]. In diesem Modell wird die Kanalfunktion nicht beeinträchtigt, die Kinaseaktivität ist jedoch ausgeschaltet und die Tiere sind lebensfähig.

Verdeutlicht wird die Abhängigkeit des Kanals von der Kinase noch einmal am Beispiel der heterozygoten Tiere (*Trpm7<sup>+/-K</sup>*). Diese sind lebensfähig, entwickeln jedoch bei einer eingeschränkten Magnesium Aufnahme, eine Hypomagnesiämie [31].

Wie genau sich Kinase und Kanal gegenseitig beeinflussen, ist noch weitestgehend ungeklärt. Es wird jedoch vermutet, dass das durch die Kanalpore einströmende Magnesium-Ionen, für die Funktion der Kinasedomäne nötig sind [34, 35], während aber der Kanal strukturell von der Kinasedomäne, nicht aber deren Aktivität, abhängt [28, 31]. Die TRPM7-Kinase benötigt für ihre Funktion  $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  und verwendet hauptsächlich Mg-ATP für die Phosphorylierungsreaktion. Ein hohes Maß an Autophosphorylierung von TRPM7 erhöht die Substraterkennung und die Aktivität der Kinase [36, 37].

Betrachtet man die vielfältige Expression von TRPM7, wird die fundamentale Rolle des Proteins in der zellulären Physiologie deutlich [29]. TRPM7 spielt in vielen Prozessen eine entscheidende Rolle: Migration, Wachstum, Proliferation, Zell Adhäsion [38], Apoptose, Differenzierung oder auch Exozytose [39]. Dies zeigt sich in zahlreichen pathophysiologischen Vorgängen an denen TRPM7 beteiligt ist, und wird durch zahlreiche Erkrankungen mit Assoziation zu TRPM7 untermauert [40].

### 3.2.1 Pathophysiologische Rolle des TRPM7-Kanals

Die Kanalaktivität des TRPM7 konnte bei einer Vielzahl an Erkrankungen des Menschen als mögliche Zielstruktur identifiziert werden. Dabei sind die Erkrankungen aufgrund der ubiquitären Expression sehr unterschiedlich.

TRPM7-Kanalfunktionen spielen in einigen Krebsarten eine Rolle, wie zum Beispiel bei malignen Gliomen [41], Brustkrebs [42], Retinoblastomen [43] oder auch Magenkrebs [44].

Innerhalb der Tumorarten nimmt der TRPM7-Kanal auf unterschiedlichste Weisen Einfluss auf die Bildung, den Erhalt oder das Wachstum des Tumors. So zeigt sich bei malignen Gliomen, dass die Blockade des Kanals zu einem durch Kalziummangel bedingten Zellzyklus-Arrest und einem Stopp der Zellproliferation führt [41]. Bei Magenkrebs führt die Blockade des TRPM7-Kanals zu vermehrter Apoptose und verringert so das Überleben der Zellen [44]. Beim



Retinoblastom hingegen, ist TRPM7 am Zellwachstum beteiligt [43] und bei Brustkrebs an der Zellproliferation [42, 45].

Während in den meisten Krebsarten eine Überexpression von TRPM7 für die Entwicklung der Erkrankung verantwortlich ist, konnte bei Thrombozytopenie eine verminderte TRPM7-Kanalfunktion als Ursache identifiziert werden. Personen mit einer Mutation im *TRPM7* (p.C721G) in ihrem Stammbaum leiden unter einer verminderten Kanalaktivität, die zu einer Makrothrombozytopenie und arterieller Fibrose führt. Durch den entstandenen Mangel an Magnesium in den Megakaryozyten kommt es zu einem fehlerhaften Zytoskelett und somit zu einem Mangel an daraus entstehenden Thrombozyten. Dieser Umstand führt bei betroffenen Personen zu einer Blutgerinnungsstörung, die meist durch die Gabe von Magnesium verringert werden kann [46].

Auch wenn die Funktionalitäten des Kanals und der Kinase nicht vollständig voneinander getrennt werden können, sind deren Beteiligungen an der Entstehung einiger Erkrankungen abzugrenzen. Dadurch eignen sich beide TRPM7-Untereinheiten als potentielle pharmakologische Zielstrukturen.

Eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration führt in der Regel zur Apoptose der Zellen. So auch beim ischämischen Schlaganfall, bei dem ein  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelter Zelltod zum Absterben der neuronalen Zellen führt. Hierbei konnte der TRPM7-Kanal als ein Hauptleiter des transmembranen  $\text{Ca}^{2+}$  Einstroms identifiziert werden. Die Blockade des Kanals unter ischämischen Bedingungen konnte den  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom verringern und damit eine Reduktion des Zelltodes bewirken [47]. In Blutplättchen reguliert vermutlich aber die Kinase über die Phosphorylierung von Syk und  $\text{PLC}_\gamma 2$ , deren Funktion bei arterieller Thrombose und ischämischen Schlaganfällen [22].

Allgemein wird Neurodegeneration durch progressiven Verlust an neuronaler Funktion und Struktur definiert, einschließlich Zellschäden, Zelltod und Erkrankungen. In all diesen zellulären Prozessen spielen der  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  eine entscheidende Rolle. Aufgrund einer Beteiligung an der Regulation von beidem, der  $\text{Ca}^{2+}$ - als auch der  $\text{Mg}^{2+}$  Homöostase von Zellen, wäre es daher naheliegend, dass TRPM7 auch bei Neuropathologien eine Rolle spielt. Dazu zählen eine Vielzahl verschiedenster Krankheiten wie Alzheimer, Morbus Parkinson, Huntington oder auch ALS (amyotrophe laterale Sklerose) [48, 49].

Für Morbus Parkinson und ALS konnten darüber hinaus Mutationen im *TRPM7* gefunden werden. Dabei ist *TRPM7* wohl als eines von mehreren Genen an der Entstehung dieser Krankheiten beteiligt [49, 50].

Auch in zahlreichen kardiovaskulären Erkrankungen [51, 52] und arterieller Hypertonie [53] spielt *TRPM7* eine Rolle. Die Kinase ist an vielen weiteren Erkrankungen beteiligt, die Immunzellen betreffen, dies wird im weiteren Verlauf der Arbeit behandelt.

Die beträchtliche Anzahl an *TRPM7*-assoziierten Erkrankungen verdeutlicht die pathophysiologische Tragweite von *TRPM7* und wirkt sich so auf ein weites Feld an biomedizinischer Forschung aus und macht *TRPM7* zu einer vielversprechenden pharmakologische Zielstruktur.

### 3.2.2 Pharmakologische Modulatoren des *TRPM7*-Proteins

Die pathophysiologische Rolle von *TRPM7* macht deutlich, wie wichtig eine pharmakologische Modulation von *TRPM7* ist. Dabei ist auch eine getrennte Aktivierung oder Blockade von Kanal und Kinase von Bedeutung. In den vergangenen Jahren konnten bereits einige Inhibitoren sowie Aktivatoren gefunden werden. Die vielversprechendsten sowie die am häufigsten verwendeten Kandidaten sind im Folgenden beschrieben und in Tabelle 1 aufgelistet.

Die Gruppe der Kanalblocker umfasst unspezifische Blocker wie 2-APB, natürliche Wirkstoffe wie Waixenicin A und auch synthetische medikamentenähnliche Verbindungen, wie Fingolimod (FTY-720).

Die in der Forschung am häufigsten angewandten Blocker des *TRPM7*-Kanals, sind NS8593, Waixenicin A, 2-APB und FTY-720. Dabei ist Waixenicin A der erste natürlich vorkommende Wirkstoff mit spezifischem und starkem inhibitorischen Effekt auf den *TRPM7*-Kanal. In Abhängigkeit von intrazellulärem Magnesium inhibiert er *TRPM7* mit einem  $IC_{50}$  von 7,0  $\mu$ M (kein freies intrazelluläres  $Mg^{2+}$ ) bis 16 nM (700  $\mu$ M freies intrazelluläres  $Mg^{2+}$ ). Die *TRPM7*-abhängige Proliferation von RBL und Jurkat T-Zellen konnte wirkungsvoll durch Waixenicin A unterdrückt werden [54]. Darüber hinaus inhibiert es das Wachstum und das Überleben humaner Magen- und Brustkrebszellen und blockiert die Schrittmacheraktivität der intestinalen Cajal-Zellen durch die Blockade der endogenen *TRPM7*-Ströme [55].

Mit einem  $IC_{50}$  Wert von 174  $\mu M$  ist 2-APB weit weniger selektiv und inhibiert neben TRPM7 andere Ionenkanäle, darunter weitere TRP-Kanäle wie TRPC3, TRPC5, TRPC6, TRPM2 und TRPM3 [56]. Außerdem werden neben TRPM7 auch die CRAC-Kanäle sowie SERCA blockiert [57]. Zusätzlich zur inhibitorischen Wirkung aktiviert 2-APB einige Kanäle, unter anderem TRPM6 [30], ORAI3 [58] sowie die TRP-Kanäle TRPV1, TRPV2 und TRPV3 [59].

NS8593 hingegen ist ein potenter und spezifischer Blocker nativer TRPM7-Ströme und scheint die hemmende Wirkung von  $Mg^{2+}$  zu verstärken und fungiert so als  $Mg^{2+}$  abhängiger Inhibitor. Er konnte schon in einigen *in vitro* und *in vivo* Studien in verschiedensten Zellen und Mausmodellen eingesetzt werden und neue Erkenntnisse liefern [60, 61]. So zeigte sich, dass in HEK293 Zellen unter Verwendung von NS8593 die Zellmobilität durch die Inhibition von TRPM7 geblockt war [62]. Die Beteiligung von TRPM7 an Prozessen der Migration und Invasion, entzündungshemmender Zellantworten in Mikrogliazellen, konnte durch die Blockade der Transmembranströme durch NS8593 gezeigt werden [63]. In Makrophagen wurde mithilfe von NS8593 nachgewiesen, dass TRPM7 für die Polarisierung und Proliferation von Makrophagen erforderlich ist [64].

Als einer der stärksten dieser Inhibitoren ist wohl FTY-720 zu nennen, das synthetische Homolog zu Sphingosin-1-phosphat, dieses blockiert mit der geringsten Konzentration,  $IC_{50}$  0,6  $\mu M$ , als sehr wirkungsvoll [65, 66]. Darüber hinaus ist FTY-720 ein zugelassenes Medikament, ursprünglich als Immunmodulator für Organtransplantationen [67], später auch als Therapie von Multipler Sklerose [68, 69] oder Tumoren [70]. FTY-720 ist aber zusätzlich ein Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor (S1PR) Agonist mit zahlreichen Nebenwirkungen auf weitere Subtypen dieser Rezeptoren [71]. Ein weiteres bereits zugelassenes Medikament, Midazolam, welches als Sedativum wirkt, konnte erst kürzlich als TRPM7-Blocker entdeckt werden. Dieses wird vor allem in Erkrankungen des Zentralnervensystems von Bedeutung sein. Es ist in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und konnte erste interessante Ergebnisse in der Forschung zum humanen malignen Gliom in Zusammenhang mit TRPM7 liefern [41].

Zu erwähnen gilt auch der erst kürzlich publizierte Inhibitor VER155008. Dieser inhibiert TRPM7-spezifische Ströme selektiv mit einer  $IC_{50}$  Konzentration von 0,11  $\mu M$ . Er ist damit ähnlich effektiv wie NS8593, entwickelt seine Wirkung jedoch langsamer [72].

Es gibt eine Vielzahl an Inhibitoren neben den hier gelisteten, aufgrund fehlender Spezifität oder Wirksamkeit scheint der am vielversprechendste TRPM7-Inhibitor wohl Waixenicin A zu sein.

Weit weniger viele geeignete Kandidaten gibt es für die kanalunabhängige Blockade der TRPM7-Kinase. Der erste identifizierte Inhibitor war Rottlerin, dass bereits ein bekannter Blocker der Proteinkinase C (PKC) war und somit nicht spezifisch ist [73]. Auch NH125 konnte als TRPM7-Kinase-Inhibitor identifiziert werden, jedoch ebenfalls mit bereits bekannter inhibitorischer Wirkung auf die eukaryotische Elongationsfaktor-2 Kinase (eEF-2K) sowie die *extracellular signal regulated* Kinase ERK2 [74]. Der am potentesten erscheinende Inhibitor ist der erst kürzlich identifizierte TG100-115 [75]. Aber auch dieser Kinase-Blocker ist bekannt für seine Wirkung auf eine weitere Kinase, PI3K $\gamma$  (Phosphoinositid-3 Kinase), und ist somit auch nicht spezifisch [76]. TG100-115 wird dennoch für die unabhängige Forschung von Kanal - und Kinase Einheit des TRPM7-Proteins verwendet - aus Mangel an besseren Alternativen.

**Tabelle 1:** TRPM7 Modulatoren

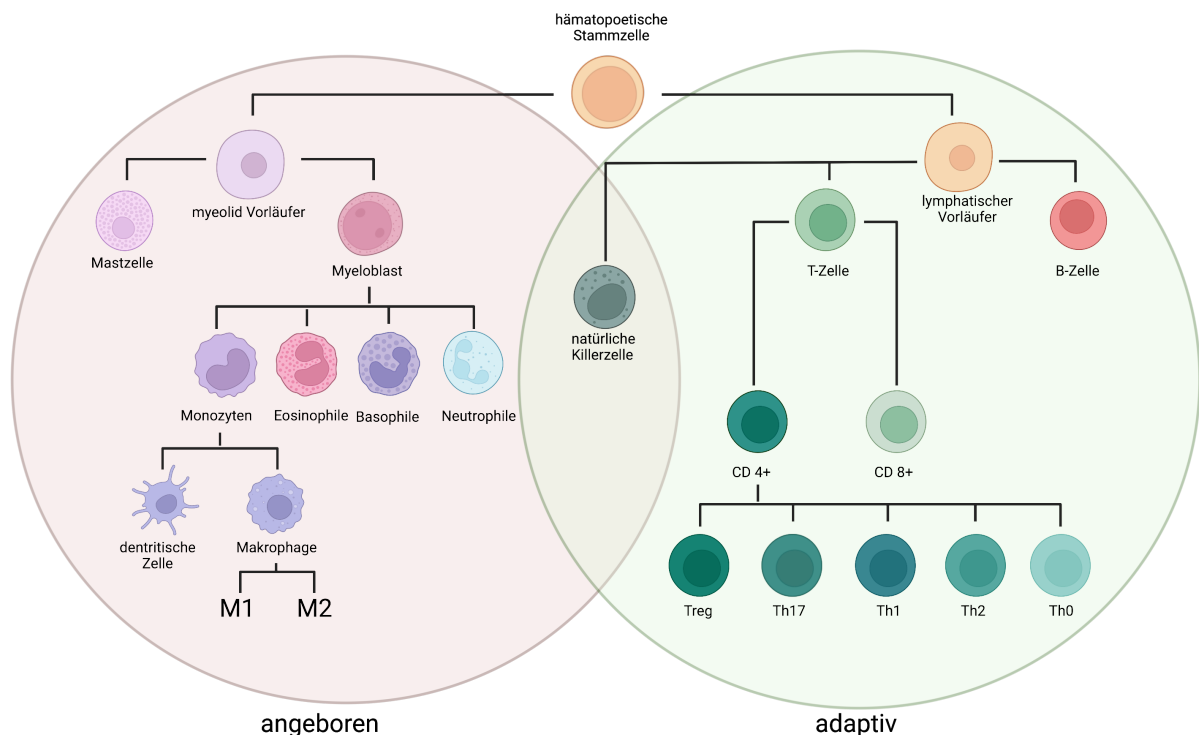
| <i>Art der Modulation</i> | <i>Wirkstoff</i> | <i>IC<sub>50</sub> (μM)</i> | <i>Beschreibung</i>                                     | <i>Referenz</i> |
|---------------------------|------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------|
| <i>Kanalblocker</i>       | 2-APB            | 174                         | Reversibel, TRPM6 steigernd                             | [56, 77]        |
|                           | NS8593           | 1,6                         | Reversibel, [Mg <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> abhängig   | [62]            |
|                           | Waixenicin A     | 7,0                         | Irreversibel, [Mg <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> abhängig | [54]            |
|                           | Fingolimod       | 0,7                         | Reversibel                                              | [66]            |
|                           | Spingosine       | 0,6                         | Reversibel                                              | [66]            |
|                           | Midazolam        | 75,1 – 159,8                | Reversibel                                              | [41]            |
|                           | VER155008        | 0,11                        | Irreversibel                                            | [72]            |
| <i>Aktivator</i>          | Naltriben        | 20,7                        | Reversibel, [Mg <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> unabhängig | [78]            |
|                           | Mibefradil       | 53                          | Reversibel, [Mg <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> abhängig   | [79]            |
| <i>Kinase-Inhibitor</i>   | TG100-115        | 1,07                        | ATP kompetitiv                                          | [75]            |
|                           | Rottlerin        | 35                          | Unspezifisch, (Inhibitor PKC)                           | [73]            |
|                           | NH-125           | 55                          | Unspezifisch, (Inhibitor eEF <sub>2</sub> , ERK)        | [74]            |

Unter Berücksichtigung des aktuellen Stands der Forschung ist anzunehmen, dass das TRPM7-Konstitut aktiv ist, wenn die zytoplasmische Mg<sup>2+</sup> Konzentration sinkt. Dennoch konnten einige wenige Aktivatoren für TRPM7 gefunden werden. Es handelt sich dabei um kleine molekulare Verbindungen, von denen Naltriben und Mibefradil am besten untersucht wurden [78]. Die aktivierende Wirkung ist für beide reversibel, interessant ist aber die Mg<sup>2+</sup> unabhängige Funktion von Naltriben. Des weiteren kann Naltriben die hemmende Wirkung von NS8593 auf die TRPM7-Ströme kompetitiv aufheben [62]. Der direkte Vergleich mit nahen Verwandten des TRPM7 Proteins wie TRPM2, TRPM8 und TRPV1 zeigte, dass Naltriben relativ

spezifisch für TRPM7 ist [78]. Mibefradil ist neben den aktivierenden Eigenschaften auf TRPM7 auch ein T- und L-Typ Kalziumblocker, und ist im Gegensatz zu Naltriben stark abhängig von der intrazellulären Magnesiumkonzentration [79].

### 3.3 Das Immunsystem und die Rolle von TRPM7

Das Immunsystem schützt unseren Körper vor Infektionen unterschiedlichster Erreger. Dabei greift es auf verschiedene Prozesse zurück, die je nach Art der Gefahr ablaufen und sich in zwei Abwehrarten unterteilen lassen, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Dabei spielen viele verschiedenen Zelltypen eine wichtige Rolle, die entweder myeloiden oder lymphoiden Ursprungs sind [80, 81].



**Abbildung 3: Stammbaum der Zellen des Immunsystems.** Das Immunsystem besteht aus zwei Hauptabwehrarten, dem angeborenen (rot) und dem adaptiven (grün) Immunsystem. Alle Immunzellen leiten sich aus hämatopoetischen Stammzellen ab, die sich entweder in myeloiden oder lymphatischen Vorläuferzellen differenzieren. Aus den Vorläuferzellen leiten sich dann die spezifischeren Zellen ab. Abgebildete wurden die wichtigsten Zellen des Immunsystems. Die Pfeile zeigen die Abstammungsbeziehung an. Die Abbildung wurde mittels BioRender entworfen.

Sowohl bei der adaptiven als auch bei der angeborenen Immunantwort gibt es eine humorale sowie eine zelluläre Immunantwort. Das angeborene Immunsystem fungiert als schnelle Verteidigung und wird auch als unspezifisch bezeichnet, da es sich gegen ein weites Spektrum an Pathogenen richtet und nicht anpassungsfähig ist. Die adaptive Immunität hingegen ist zielgerichtet und bildet ein Gedächtnis gegen bereits bekannte Erreger [81, 82].

Dabei wird die Art der Immunantwort von der dynamischen Interaktion der Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems, sezernierten Faktoren und Antigenen bestimmt. Die Zellen kommunizieren untereinander und aktivieren dabei die verschiedensten Signalwege und Reaktionen des Körpers [81].

Zweiwertige Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  spielen als sekundäre Botenstoffe eine entscheidende Rolle im Immunsystem. Störungen in deren Funktion werden mit Erkrankungen des Immunsystems assoziiert und bieten neue mögliche Ansatzpunkte für neue therapeutische Strategien [83, 84].

Von Kationen abhängige komplexe intrazelluläre Signalkaskaden sind für die Aktivierung von Immunzellen unabdingbar. Über Antigenpräsentierende Zellen (APC), wie dendritische Zellen, B-Zellen oder Makrophagen, wird der T-Zell Rezeptor (TCR) aktiviert. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung der Phospholipase  $\text{C}_\gamma 1$  ( $\text{PLC}_\gamma 1$ ), die ihrerseits die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-(1,4,5)-triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) katalysiert.  $\text{IP}_3$  aktiviert nun über die Bindung an seinen Rezeptor, die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem  $\text{Ca}^{2+}$  Speicher des Endoplasmatischen Retikulums (ER), wodurch DAG in Verbindung mit dem freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$  die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Nach der vollständigen Erschöpfung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher transloziert das „stromal-interaction molecule“ (STIM) an die Plasmamembran der Zelle und aktiviert den sogenannten „store operated calcium entry“ (SOCE) über den CRAC (Calcium Release Activated Calcium) -Kanal, [85, 86], welches wohl eine der am besten erforschten Initialereignisse in der Leukozytenaktivierung darstellt [87-89].

Andere Kationen sind in der Immunzellfunktion weniger gut erforscht, scheinen aber eine genauso bedeutende Rolle zu spielen, wenn man die Beteiligung von  $\text{Mg}^{2+}$  am Überleben und der Proliferation von Immunzellen betrachtet [84]. Deutlich wird die Relevanz bei der Signalverarbeitung über Kationen für die Immunreaktion auch bei menschlichen Immundefekten mit gestörten  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  Strömen [87, 90].

Bei humanen Immunschwächen hat sich gezeigt, dass die Funktion des sogenannten  $Mg^{2+}$  Transporters MAGT1 wesentlich für die T-Zell-Aktivierung ist. Es wurde postuliert, dass durch die  $Mg^{2+}$  Aufnahme über MAGT1 auch hier die  $PLC\gamma_1$  und die wiederum SOCE aktiviert wird, und  $Mg^{2+}$  eine Rolle als sekundärem Botenstoff zuspricht [90]. Später wurde diese Ansicht revidiert und MAGT1 als nicht katalytisches akzessorische Protein identifiziert. MAGT1 ist Teil des N-gebundenen Glykolyse Prozessen, der in T-Zellen sowie NK-Zellen für die Bildung des NK-Zellrezeptors benötigt wird. Eine Mutation des MAGT1 führt somit sowohl zu einem Abfall des intrazellulären  $Mg^{2+}$  als auch zu einer verringerten Glykolyse und damit verbundenen Fehlen des NK-Zellrezeptors [91, 92].

Bei der Bildung proentzündlicher Zytokine in Makrophagen und bei der Markierung von Zielzellen für natürliche Killer (NK) Zellen, scheint  $Zn^{2+}$  eine tragende Rolle zu spielen [93, 94]. Eine  $Zn^{2+}$  Supplementation bei Mäusen zeigt eine gesteigerte Phagozytose durch peritoneale Makrophagen [95, 96]. Auf der anderen Seite resultiert ein  $Zn^{2+}$  Mangel in einer reduzierten Phagozytose, der Produktion von reaktiven-Sauerstoffspezies (ROS), Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen sowie Netose von Neutrophilen [97].

TRPM7 ist für alle drei Kationen  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  leitfähig und bringt somit ein großes Potential für die Regulation von Kationen des Immunsystems mit sich.

### 3.3.1 Die Rolle der TRPM7-Kanalkinase im Immunsystem

TRPM7 spielt sowohl als Kanal als auch als Kinase eine entscheidende Rolle in der Signalweiterleitung von Immunzellen. Dabei scheint die Kinasedomäne eine größere Rolle in der Immunmodulation zu besitzen. Auch wenn das durch die Poren einströmende  $Mg^{2+}$  für die Funktion der Kinase essentiell zu sein scheint und somit auch dem Kanal ein entsprechender Anteil zuzuschreiben ist.

#### 3.3.1.1 TRPM7 in Mastzellen

Mastzellen sind Granulozyten gefüllt mit Histamin, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen und vermitteln so allergische Reaktionen und entzündliche Prozesse [98, 99]. Unter normalen physiologischen Bedingungen degranulieren Mastzellen über zwei Wege: 1) dem Anstieg an intrazellulärem  $Ca^{2+}$  oder 2) über die Aktivierung eines G-Proteins [100, 101].

Die Aktivierungskaskade der Mastzellen über ihren Rezeptor inkludiert den bereits angesprochenen  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom über SOCE, an dem die Beteiligung von TRPM7 bereits gezeigt werden konnte [102, 103]. Die ersten Hinweise auf eine Beteiligung an Degranulationsprozessen und der Freisetzung von Zytokinen durch TRPM7 wurden in Mastzellen aus dem Knochenmark von Ratten (BMMC) gewonnen. Durch pharmakologische sowie genetische Hemmung von TRPM7 in BMMCs asthmatischer Tiere, wurde eine verringerte Ausschüttung von Histaminen und pro-inflammatorischen Zytokinen sowie eine verminderte Aktivität der  $\beta$ -Hexosamidase beobachtet [104]. Hierbei kam zur pharmakologischen Hemmung jedoch der TRPM7-Antagonist 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) zum Einsatz. Die Konzentration des 2-APB die für diesen Versuch eingesetzt wurde, blockiert die Kalziumkanäle (CRAC), die normalerweise bei SOCE für den Kalziumeinstrom sorgen [57]. Somit konnte hierbei nicht eindeutig festgestellt werden, ob und inwiefern TRPM7 beteiligt ist. Jedoch wurden die Ergebnisse bei der Inhibition von TRPM7 in primären BMMC durch eine lentivirale siRNA bestätigt [104]. Die Frage jedoch, ob Kinase- oder Kanal-Aktivität verantwortlich, sind blieb offen.

Die Verwendung von Mastzellen aus den Kinase-defizienten Mäusen (*Trpm7<sup>+/-</sup>* und *Trpm7<sup>ΔK</sup>*) zeigten, dass die G-Protein-gekoppelte rezeptoraktivierte Histaminfreisetzung, unabhängig vom Kanal durch die Kinase negativ reguliert wird [100].

### 3.3.1.2 TRPM7 in Neutrophilen

Die am häufigsten vorkommenden Leukozyten im Blutkreislauf sind Neutrophile Granulozyten. Sie gelten bei einer akuten Entzündungsreaktion als die am schnellsten reagierenden Zellen der angeborenen Immunität. Sie migrieren an den Ort der Entzündung, beseitigen Pathogene, locken durch Chemokinausschüttung weitere Leukozyten an und halten so die Gewebemöostase aufrecht [105, 106].

Für die Rekrutierungskaskade und die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten ist eine Signalübertragung mittels  $\text{Ca}^{2+}$  von zentraler Bedeutung [107]. Es wird vermutet, wenn auch kontrovers diskutiert, dass die Kalzium-induzierte Chemotaxis, die Fähigkeit der Adhäsion sowie der Invasivität von Neutrophilen Granulozyten über den TRPM7-Kanal vermittelt wird [108].

Neueste Studien konnten zudem eine Beteiligung der TRPM7-Kinase bei der Migration der Neutrophilen Granulozyten durch Modulation des AKT/mTOR-Signalweges belegen. Durch die



pharmakologische Blockade der Kinase durch TG110-115 humaner Neutrophiler war die Chemotaxis entlang des CXCL-8 Gradienten sowie die ROS-Produktion im Zuge einer LPS-Aktivierung beeinträchtigt. Auch in murinen TRPM7-Kinasedefizienten Neutrophilen Granulozyten, zeigte sich eine verringerte Chemotaxis entlang des CXCL1-Gradienten [60].

### *3.3.1.3 TRPM7 in Makrophagen*

Ähnlich wie Neutrophile halten auch Makrophagen die Homöostase des Gewebes aufrecht, indem sie abgestorbene Zellen, Ablagerungen und potentielle pathogene Erreger phagozytieren. Makrophagen sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort, als antigenpräsentierende Zellen aber auch für die adaptive Immunantwort von großer Bedeutung [109, 110].

Sie können durch ihre unterschiedliche Polarisierung in zwei Subtypen unterteilt werden, die einerseits pro- (M1) und andererseits anti- (M2) inflammatorisch sind. LPS und INF $\gamma$  (pro-inflammatorischer M1-Typ) oder IL-4 und IL-13 (anti-inflammatorischer M2-Typ) lösen Proliferation und Polarisierung der Makrophagen aus [111, 112]. Die Rolle von Trpm7 wurde mit der Polarisierung, Proliferation, Zytokinsekretion und Makrophagen vermittelte Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht, aber auch kontrovers diskutiert [64, 113-115].

In früheren Studien wurde gezeigt, dass die Aktivität von TRPM7 unter Polarisationsbedingungen in Subtyp M2 signifikant ansteigt, während es im Vergleich zu den Bedingungen in M1 unverändert bleibt. Die TRPM7 Inhibitoren NS8593 [62] und FTY-720 [64], wirken der Differenzierung in den M2-Typ entgegen. Die Inhibition von TRPM7 blockiert die IL-4 und M-CSF induzierte Proliferation, blockiert darüber die hemmende Wirkung von IL-4 auf die LPS-induzierte Expression des proentzündlichen Zytokins TNF $\alpha$  und wirkt so der M2-Differenzierung entgegen [64, 116]. In TRPM7-defizienten Makrophagen wurde gezeigt, dass TNF- $\alpha$  sowie IL-6 hochreguliert wurden und durch Supplementation von Mg<sup>2+</sup> dieser Effekt wieder abgeschwächt wurde [117]. Diese Ergebnisse deuten auf die Beteiligung von Trpm7 auf die Polarisierung von Makrophagen in den anti-inflammatorischen M2-Typ hin.

Aber auch Hinweise auf die Beteiligung von TRPM7 an pro-inflammatorischen Prozessen der Makrophagen konnten gefunden werden. Es wurde gezeigt, dass der TRPM7 vermittelte extrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Einstrom bei der LPS-induzierten Aktivierung der entzündungsfördernden NF $\kappa$ B Signaltranskription erforderlich ist [113, 118]. Eine weitere Studie zeigte zudem, dass bei

der Blockade von TRPM7 die Polarisation in den M1-Subtyp vermindert wird. Die Autoren vermuten eine Herunterregulation der TNF $\alpha$  und iNOS Expression über den STAT1/STAT6-Signalweg, wobei die Phosphorylierung von STAT1 inhibiert und dadurch die STAT6 Phosphorylierung begünstigt wird [119].

Die widersprüchlichen Beobachtungen können verschiedene Ursachen haben, unspezifische pharmakologische Wirkstoffe oder auch die verschiedenen Krankheitsmodelle könne Ursache für die konträren Reaktionen der Zellen sein.

Es zeigt aber dennoch die entscheidende Rolle von TRPM7 bei entzündlichen Erkrankungen und somit nimmt das Protein eine wichtige Position in der medizinischen Forschung ein.

#### *3.3.1.4 TRPM7 in Lymphozyten*

Lymphozyten bilden die erworbene Immunantwort und werden über die angeborene Immunantwort aktiviert und reguliert, und verfügen über ein immunologisches Gedächtnis. Über eine aktivierungsbedingte Proliferation und klonale Expansion reagieren antigenspezifische Lymphozyten auf Krankheitserreger [120, 121].

Unter Punkt 3.3 wurde bereits die durch intrazelluläres Kalzium vermittelte Signalkaskade in Leukozyten beschrieben.

In Lymphozyten, T- und B-Zellen, wird über die Stimulation des jeweiligen Rezeptors (TCR oder BCR) eben jene Signalkaskade aktiviert. Das durch die Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> entstandene DAG aktiviert in Verbindung mit Ca<sup>2+</sup> die Proteinkinase C und induziert so die Zellproliferation.

Die zweite, aus der Hydrolyse entstandene Komponente, IP<sub>3</sub>, induziert die Ca<sup>2+</sup> Freisetzung aus dem ER, gefolgt von der Translokation des STIM an die Plasmamembran. Über ORAI/CRAC-Kanäle wird der Ca<sup>2+</sup> Einstrom aus dem extrazellulären Raum ausgelöst, und das Ca<sup>2+</sup> aus dem Zytosol wird über die SERCA (sarco-endoplasmatische Retikulum Ca<sup>2+</sup> ATPase) entfernt und die ER-Speicher gefüllt.

Diese stetig steigende zytosolische Ca<sup>2+</sup> Konzentration führt zur Aktivierung des Enzyms Calcineurin, welches daraufhin den Transkriptionsfaktor „nuclear factor of activated T-Cells“ (NFAT) dephosphoryliert und so dessen Translokation zum Kern einleitet, was wiederum zur Zytokinexpression, zum Beispiel von IL-2, führt und die klonale Expansion von T-Zellen vermittelt [39, 122].

TRPM7 kann während dieser Signalkaskade, speziell bei SOCE, sowohl über seine Kanal- sowie auch über seine Kinasefunktion Einfluss nehmen [102].

In DT-40 Zellen wurde nachgewiesen dass die TRPM7 kein direkter Teil von SOCE ist, jedoch regulatorische Funktionen über die Kinaseaktivität übernimmt [103].

*In vitro* Studien zeigten, dass bei plattengebundener Antikörperstimulation bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Trpm7*<sup>R/R</sup> Mäusen die Ca<sup>2+</sup> Signale signifikant verringert waren, während die basale zytosolische Konzentration unverändert blieb [23]. Auch in TRPM7-defizienten Hühner B-Zellen (DT-40) wurde eine reduzierte SOCE-Aktivität beobachtet, was hauptsächlich auf die fehlende Kinasefunktion zurückgeführt wurde. Die Kanalfunktion scheint darüber hinaus ihre Aufgabe in der Aufrechterhaltung der internen Ca<sup>2+</sup> Speicher von ruhenden Zellen zu haben [102].

Kontrovers diskutiert wird jedoch die Beteiligung der Kinase an der T-Zellproliferation. Während diese bei der plattengebundenen Aktivierung des TCR in CD4<sup>+</sup> *Trpm7*<sup>R/R</sup>-Zellen unverändert blieb [23], zeigte sich bei der direkten Stimulation über PMA/Ionomycin eine reduzierte Proliferation [122].

PMA/Ionomycin ist ein starker Stimulus, während PMA direkt die PKC aktiviert und die Rezeptor Stimulation überspringt, steigert Ionomycin als Ionophor die zytosolischen Ca<sup>2+</sup> Konzentration. Abhängig von der Stimulation kann die Kinase also an der Proliferation beteiligt sein [123].

TRPM7-defiziente DT-40 Zellen sind in regulärem Medium nicht in der Lage normal zu proliferieren, mit einer hochdosierten Mg<sup>2+</sup> Supplementation verhalten sie sich jedoch wie WT-Zellen. Nach dem erneuten Entzug von Mg<sup>2+</sup> akkumulieren die Zellen nach 24h in der G0/G1 Phase des Zellzyklus und nehmen weder an Masse noch an Größe zu. Dieser Defekt konnte nur über einer konstitutiven aktiven Form der PI3K überwunden werden und ermöglichte den TRPM7-defizienten B-Zellen in regulärem Medium zu wachsen. Die Phosphoinositid-3-Kinase gilt als ein zentraler Bestandteil der zellulären Homöostase und ist vor allem am Signalweg von AKT beteiligt und ist hierin maßgeblich an der Regulation des Lymphozyten Wachstum beteiligt, dadurch lässt sich vermuten, dass auch TRPM7 in diesem wichtigen Prozess eine Rolle spielt [124]. Außerdem konnte gezeigt werden das TRPM7 für die Zellzyklusprogression wesentlich ist. In den TRPM7-defizienten DT-40 B-Zellen konnte eine Hochregulation von p27kip gezeigt werden, welches ein wichtiger Regulator des Zellzyklus ist und den Übergang von G0 zur S-Phase blockiert [125]. Die Beteiligung von Kanal und Kinase

an frühen Ereignissen bei der B-Zell Aktivierung zeigen Versuche unter Verwendung derselben DT40-Zelllinie ohne das vollständige TRPM7-Proteins und einer DT-40 Zelllinie mit Kinasedefizientem TRPM7-Proteins. Bei beiden Zelllinien akkumulierten mehr Antigene auf der Zelloberfläche, und aktivierten ein stärkeres B-Zellrezeptor-abhängiges Signal. Zusätzlich wird vermutet, dass TRPM7-Signale essenziell für die Affinitätsreifung von B-Zellen und für deren Antikörperproduktion unabdingbar sind. Die Expression von TRPM7 in B-Zellen kontrolliert die Dynamik von Actin und verlangsamt die Antigeninternalisierung, was zu einem verlängerten Signal in den B-Zellen führt [126].

In murinen B-Zellen scheint TRPM7 für die Entwicklung von B-Zellen dringend erforderlich zu sein. Aufgrund eines Entwicklungsdefekts in der Pro-B-Zell-Phase und vermehrter Apoptose von B-Zell-Vorläuferzellen, waren Mäuse mit einer gewebespezifischen Mutation des TRPM7 in B-Zellen unfähig, periphere B-Zellen zu generieren. Interessanterweise hatte die Mutation, nur in der Kinase, keinen Einfluss auf die Entwicklung und die Anzahl an peripheren B-Zellen [127].

Die enzymatische Aktivität von TRPM7 ist entscheidend für die intraepitheliale T-Zell (IEL)-Homöostase. Rund 70 % aller Lymphozyten des menschlichen Körpers sind im Darm beheimatet. Hier differenzieren sie sich in zahlreiche Effektor-T-Lymphozyten und wandern in die Peripherie aus[128-130]. *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäuse haben nahezu keine intraepithelialen T-Zellen im Darm. Bei der Analyse des prozentualen Anteils der verblieben IELs zeigte sich eine signifikante Verringerung der pro-inflammatorischen T<sub>H</sub>17 Zellen, während der prozentuale Anteil der anti-inflammatorischen T<sub>reg</sub> Zellen im Vergleich zum WT unverändert blieb. Auch die Differenzierung *in vitro* in T<sub>H</sub>17 Zellen aus *Trpm7<sup>R/R</sup>* CD4<sup>+</sup> Zellen war beeinträchtigt, und im Serum der *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäuse war die Konzentration an IL-17 stark verringert [23].

Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass TRPM7 am TGF- $\beta$ /SMAD Signalweg beteiligt ist, der für die Polarisierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen entscheidend ist [131]. Naive *Trpm7<sup>R/R</sup>* CD4<sup>+</sup> T-Zellen, zeigen nach TGF- $\beta$  Stimulation eine geringere Phosphorylierung von SMAD2, während die SMAD3 Phosphorylierung unverändert blieb. Diese Ergebnisse sprechen dafür dass die Kinase Aktivität über den TGF- $\beta$ /SMAD abhängigen Signalweg die T<sub>H</sub>17 Differenzierung reguliert.

Auch das Integrin CD103, welches den T-Zellen die Migration in das Darmepithel ermöglicht und ebenfalls von der TGF- $\beta$ /SMAD Signalkaskade abhängig ist, war in naiven CD4<sup>+</sup> *Trpm7<sup>R/R</sup>*

T-Zellen reduziert. Auch der charakteristische Transkriptionsfaktor für T<sub>H</sub>17 Zellen, Rorc sowie das Zytokin IL-17, die beide abhängig von der Phosphorylierung sowie der Translokation in den Zellkern von Smad2 sind, waren in *Trpm7<sup>R/R</sup>* T-Zellen reduziert. Zusammengenommen sprechen alle diese Faktoren klar für eine Beteiligung der TRPM7-Kinase am TGF-β/SMAD Signalweg [23].

Wie genau TRPM7 hierbei beteiligt ist, ist noch nicht eindeutig geklärt. Es liegt aber nahe, dass die konstitutiv aktive TRPM7-Kinase, SMAD2 phosphoryliert sobald dieses nach TGF-β-Rezeptoraktivierung an der Plasmamembran verankert ist [23]. Diese Ergebnisse machen die TRPM7-Kinase daher besonders für Autoimmunerkrankungen und entzündliche Prozesse interessant, bei denen vor allem die pro-inflammatorische T-Zellpopulation T<sub>H</sub>17 als therapeutisches Ziel bekannt ist.

### 3.3.2 TRPM7 in Autoimmun- und pro-entzündlichen Erkrankungen

Unser Immunsystem ist ein hochkomplexer Mechanismus, der uns vor pathogenen Erregern schützt. Ist die Kommunikation zwischen den Zellen gestört, kommt es zu fehlgeleiteten Reaktionen, die sich gegen uns selbst richten und Autoimmunerkrankungen verursachen können. Autoimmunerkrankungen können in zwei Typen unterteilt werden: organspezifische, wie Multiple Sklerose (MS) oder Diabetes Mellitus (DM) oder systemische, wie Rheumatoide Arthritis (RA) oder *Lupus erythematoses* [65].

Ungerichtete Entzündungen haben meist irreversible Gewebeschäden zur Folge. Eine funktionierende Regulation aller beteiligten Zellen ist daher von großer Bedeutung für die Gesundheit.

Die genaue Ätiologie der meisten Autoimmunerkrankungen ist noch weitestgehend ungeklärt. Es werden einige genetische Prädispositionen und Umwelteinflüsse vermutet. Genomweite Assoziationsstudien konnten für einige Autoimmunerkrankungen eine Akkumulation bestimmter Genvarianten feststellen [132]. Die meisten dieser Varianten kommen in regulatorischen Bereichen von Genen vor, die stark mit Immunantworten assoziiert sind [133]. Daher werden in der konventionellen Therapie bei fast allen Autoimmunerkrankungen Immunsuppressiva verabreicht, die mit enormen Nebenwirkungen einhergehen. Zusätzlich dazu erfolgt die Einnahme dieser Medikamente meist auf Lebenszeit, da die Krankheiten des Immunsystems einen chronischen Charakter zeigen. Eine zielgerichtete Therapie ist daher von großer Bedeutung, um einerseits den Kern der Erkrankung zu treffen und andererseits die

Nebenwirkungen zu reduzieren und die Einnahmedauer von Medikamenten zu verkürzen [65].

In der Vergangenheit wurde TRPM7 schon mehrfach als mögliche therapeutische Zielstruktur für verschiedene Autoimmun- oder systemisch entzündliche Erkrankungen, wie RA, MS, Typ-1 Diabetes Mellitus (T1DM) oder *Graft-versus-Host*-Erkrankung (GvHD), vorgestellt [65].

Die RA ist eine chronische Erkrankung bei der die Patienten unter Synovitis, einer immer weiter fortschreitenden schmerzhaften Schädigung der Gelenke, sowie unter Gelenkfehlbildungen leiden [134, 135]. Dabei scheint TRPM7 an der Dysregulation der Immunzellen involviert zu sein, fördert dabei den chronischen Charakter dieser Erkrankung [108, 136] und scheint in verschiedenen Zelltypen eine Rolle zu spielen. Bei der Überexpression in fibroblastischen Synoviozyten (FLS) in Ratten waren die RA-Symptome deutlich stärker. Umgekehrt führte die Inhibition von TRPM7 mittels siRNA, 2-APB oder  $Gd^{3+}$  zur Hemmung der Proliferation dieser Zellen. Die atypische Proliferation von FSL bei RA-Patienten führt zu irreversiblen Gelenkschäden, weswegen eine zielgenaue Unterdrückung dieser Zelltypen für RA-Patienten eine deutliche Linderung bedeuten kann und TRPM7 als therapeutische Zielstruktur hervorhebt [136].

Unverhältnismäßige Entzündungsreaktionen können durch eine übermäßige Infiltration von Neutrophilen beschleunigt werden und begünstigen so Erkrankungen wie RA. Die Migration und Invasion von Neutrophilen kann durch den  $Ca^{2+}$  Einstrom via TRPM7 begünstigt werden [108]. Aber auch über die Kinase ist TRPM7 an der Neutrophilen-Regulation beteiligt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Kinase über den AKT/mTOR Signalweg für die Rekrutierung und Funktion von Neutrophilen von großer Bedeutung ist [60].

Die Expression von *Trpm7* ist signifikant erhöht im Mausmodell der T1DM, und die Inaktivierung von TRPM7 auf molekularer Ebene reduziert das Ausmaß der Apoptose in T1DM-Hippocampuszellen. Darüber hinaus führt die Inhibition von TRPM7 in diesen Mäusen zu einer Hemmung des Streptozotoci-induzierten Gewichtsverlust, des verringerten Nüchterninsulinspiegels mit gleichzeitig erhöhtem Nüchternglucosespiegel, steigert den Spiegel von Inselzellantikörpern sowie Insulin-Autoantikörpern [65, 137]. In primären Maus-Inselzellen führte die Reduktion der TRPM7 Expression, zu einem starken Anstieg des Insulinspiegels nach Verabreichen von Glukose. Wie genau TRPM7 hier aber eine regulatorische Rolle einnimmt ist

unklar, zeigt aber dennoch, dass TRPM7 Einfluss hat und auch hier als therapeutische Zielstruktur von großem Interesse ist [138]. Neuste Studien identifizierte die TRPM7-Kinase als potentiellen neuen Regulator der Insulinproduktion sowie der Glykosehomöostase unter adipöser Ernährung. Eine  $\beta$ -Zelle spezifische Deletion von *Trpm7* in Mäusen, führte zu einer verringerten Insulinproduktion der  $\beta$ -Zellen, was wiederum zur einer fortschreitenden Glukoseintoleranz der Mäuse führte. Die verringerte Kinaseaktivität des TRPM7 in den  $\beta$ -Zellen führte zu einer signifikant verminderten Phosphorylierung von AKT und ERK1/2. Durch den abgeschwächten Akt/Erk Signalweg ist auch die Phosphorylierung von *pancreatic and duodenal homebox 1* (PDX1) reduziert, welches für die Insulinsekretion benötigt wird [139].

Das als TRPM7 Blocker bekannte Medikament Fingolimod ist eines der ersten Medikamente zur Behandlung von MS [68]. Daher ist es wenig verwunderlich, dass TRPM7 an der Entstehung und dem Fortschreiten dieser Krankheit involviert sein könnte. T-Lymphozyten und Zytokine spielen dabei eine entscheidende Rolle. Speziell die  $T_H17$  Populationen, die vor allem IL-17 sezernieren, spielen bei Autoimmunerkrankungen eine wesentliche Rolle [140, 141]. In mononuklearen Zellen des Cerebrospinal Flüssigkeit (CSF) akuter MS Patienten, ist die IL-17 mRNA hochreguliert, und auch ein Anstieg von INF $\gamma$  verschlimmert den Verlauf von MS [142]. Die genetische Inaktivierung der TRPM7-Kinase reduziert die Produktion von Zytokinen, inklusive von IL-17 und INF $\gamma$  in murinen T-Zellen, und verringert die Differenzierung in  $T_H17$  Zellpopulationen [23]. Diese Ergebnisse weisen alle daraufhin, dass die Inhibition von TRPM7 eine therapeutische Strategie für die Behandlung von MS darstellt.

Die GvHD ist eine systemisch entzündliche Erkrankung und die häufigste Nebenwirkung nach Stammzellentransplantationen, die sich hauptsächlich gegen den Darm, die Haut und die Leber richten. Hierbei erkennen die T-Zellen des Spenders das humane Leukozytenantigen des Empfängers als fremd und lösen so eine Entzündungskaskade aus [143]. Mithilfe des *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mausmodells konnte Romagnani et.al zeigen, dass die Kinase maßgeblich an der Entstehung von GvHD beteiligt ist. Hierzu wurden Balbc/WT-Mäuse mit einer letalen Dosis bestrahlt und Knochenmark aus WT Mäusen zusammen mit Splenozyten, aus entweder *Trpm7<sup>+/+</sup>* oder *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäusen, transplantiert. Mäusen die mit WT-Splenozyten transplantiert wurden, erlitten massive Entzündungsreaktionen im Darm, einhergehend mit schweren Darmschäden

und verstarben innerhalb kürzester Zeit. Diejenigen Tiere mit die Kinase-defizienten Splenozyten transplantiert bekamen, zeigten jedoch keinerlei Schädigungen des Darmes [23].

Gerade durch die Ergebnisse der TRPM7-Kinase-Beteiligung an der Differenzierung von T-Zellen und den regulatorischen Einfluss auf die Immunzellhomöostase, wird das Interesse an Kinaseinhibitoren in Bezug auf Autoimmunerkrankungen größer. Ein Ungleichgewicht zwischen regulatorischen und pro-inflammatorischen T-Zellen, ist ein häufiger Auslöser für eine T-Zell basierte Autoimmunität. Durch die Behandlung dieser Erkrankungen mittels der vollständigen Unterdrückung der Immunantwort sind die Patienten stark geschwächt und werden anfällig für weitere Krankheiten. Die TRPM7-Kinase stellt hierbei eine pharmakologische Zielstruktur von hohem Interesse dar. Gerade die Ergebnisse, die zeigen, dass bei der genetischen Inaktivierung der Kinasefunktion, die  $T_H17$  Differenzierung stark reduziert ist, die  $T_{reg}$  Zellen jedoch unverändert proliferieren, sind für T-Zellvermittelte Erkrankungen von hoher Bedeutung.

### 3.4 Multiple Sklerose, eine T-Zell vermittelte Autoimmunität

Die multiple Sklerose ist die am häufigsten vorkommende Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems [144]. Sie ist charakterisiert durch den Abbau der Myelinschicht von Nervenzellen, Schädigung der Axone und Neurodegeneration, vermittelt durch Entzündungsreaktionen. Die genaue Pathophysiologie ist unbekannt, es wird jedoch vermutet, dass mehrere Ereignisse zur Entstehung beitragen [145]. Der Verlauf und das Fortschreiten ist meist eine T-Zellvermittelte Autoimmunität, bei der sich die T-Lymphozyten gegen das Myelin-Protein richten und so Läsionen im ZNS verursachen [146].

Klinisch wird die MS in drei verschiedene Verlaufsformen eingeteilt 1) primär progrediente MS (PPMS), 2) schubförmig remittierende MS (RRMS), 3) sekundär progrediente MS (SPMS). Die am häufigsten vorkommende Form ist RRMS, die im weiteren Verlauf meist in die SPMS übergeht. Bei der RRMS treten die Symptome in Schüben auf, die sich anschließend vollständig oder teilweise zurückbilden und die Patienten zeitweise symptomfrei und ohne Schübe leben. Bei einem großen Teil der RRMS Patienten geht die Erkrankung in die SPMS über. Im Anschluss an die Schübe können sich die Patienten nicht vollständig erholen, es kommt zu Einschränkungen, bis die Krankheit den schubförmigen Charakter verliert, und sie dauerhaft



fortschreitet. Eher selten dagegen ist die PPMS, bei der die Patienten von Anfang an eine dauerhafte Progression der Erkrankungen zeigen [147].

Derzeit ist MS nicht ursächlich heilbar, es sind aber einige Therapien für die Folgen verfügbar. Es gibt allerdings einige Behandlungsmöglichkeiten um das Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten oder zu verlangsamen, Entzündungen zu hemmen, und es gibt allgemeine Symptomtherapien [148]. Dabei werden häufig Immunmodulatoren eingesetzt, die nicht nur den proentzündlichen Teil des Immunsystems hemmen, sondern auch den regulatorischen Bereich unterdrücken, und so auch die positiven Effekte des Immunsystems unterdrücken [149-151].

Es wurde bereits gezeigt, wie wichtig die regulatorischen Zellen des Immunsystems für die Heilungschancen in Autoimmunerkrankungen sind. Genetische Defekte im *FoxP3* Gen, welches für das hauptregulatorische Molekül der  $T_{reg}$  Zellen kodiert, haben fatale Auswirkungen auf Autoimmunerkrankungen und führen zu aggressiven Verlaufsformen [152]. Defekte im Signalweg zur Differenzierung in die  $T_H17$  Populationen im Tiermodell zeigen eine deutlich reduzierte Symptomatik und eine verbesserte Erholung. T-Zellen, die IL-17 sezernieren, haben also eine entscheidende pathogene Rolle in Autoimmunerkrankungen [146].

Beide T-Zell-Populationen teilen den gleichen Vorläufer, naive  $CD4^+$  T-Zellen und benötigen beide ein TGF- $\beta$  Signal zur initialen Differenzierung [141]. Die An- oder Abwesenheit von pro-entzündlicher Zytokinen, wie IL-6 oder IL-21, bedingt im weiteren Verlauf die Richtung der Differenzierung. Während sich die  $T_H17$  Zellen in pro-inflammatorische Effektorzellen weiter differenzieren, entwickeln sich die  $T_{reg}$  Zellen in anti-inflammatorische Zelltypen weiter [141, 153]. Die  $T_H17$  Zellpopulation ist meist für die Entstehung von Autoimmunität maßgeblich, indem sie massive Entzündungsreaktionen auslösen.  $T_{reg}$  Zellen hingegen halten die Immunhomöostase aufrecht und regulieren die Entzündungsreaktionen der  $T_H17$  Zellen. Das zeigt deutlich, wie wichtig es ist, das  $T_H17$  und  $T_{reg}$  in einem Gleichgewicht zu halten und die zugrunde liegende Mechanismen zu verstehen [153].

#### 3.4.1 Experimentelle Tiermodelle – Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Die EAE ist das am häufigsten verwendete Mausmodell für Autoimmunerkrankungen des zentralen Nervensystems und ähnelnd dabei der multiplen Sklerose [154, 155]. Die Symptome

erkrankter Tiere äußern sich vorwiegend in motorischen Störungen bis hin zu Lähmungserscheinungen und stimmen damit in weiten Teilen mit denen der multiplen Sklerose überein. Wie viele Mausmodelle hat auch die EAE Limitationen und kann nicht das genaue Krankheitsbild der MS widerspiegeln. Ein Hauptunterschied der EAE zur MS ist dabei die externe Immunisierung um sich zu entwickeln. In der EAE ist zudem das Krankheitsbild auslösende Antigen bekannt, wohingegen bei der MS bisher kein Antigen identifiziert werden konnte [154].

Durch das Zusammenspiel unterschiedlicher immuno- und neuropathologischer Prozesse bei der EAE zeigt sich aber eine Annäherung an die M-Symptomatik: Entzündung, Demyelinisierung und axonale Schäden. Diese Parallele der entzündlichen Prozess innerhalb des zentralen Nervensystems konnten in der Vergangenheit bereits einen entscheidenden Beitrag zu der Entwicklung neuer Therapien beitragen [154]. So wurde zum Beispiel die Wirkung der Medikamente Copaxon und Tysabri am Tiermodell untersucht und erfolgreich auf den Menschen übertragen [156-159].

Die EAE lässt sich auf verschiedene Arten induzieren und ist abhängig von der Fragestellung. Im Weiteren werden in dieser Arbeit die angewandten Immunisierungsvarianten vorgestellt.

Die aktive EAE ist die am einfachsten zu induzierende Form. Sie führt zu schnellen Ergebnissen um einen ersten Eindruck zu gewinnen ob und in welchem Ausmaß die TRPM7-Kinase Einfluss auf die EAE hat [160]. Die Tiere werden mittels eines Myelin-spezifischen Peptids, wie das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), immunisiert. Zur Auslösung einer Immunantwort wird das Peptid in einer Emulsion mit komplettem Freund-Adjuvans verabreicht. Um die Migration der Immunzellen in das ZNS zu erleichtern wird zusätzlich Pertussis Toxin verabreicht, welches für die Öffnung der Bluthirnschranke der Versuchstiere sorgt [160, 161].

Die passive EAE kommt mit einem geringeren Stimulus aus und eignet sich gut um bestimmte Effektor-Phasen zu untersuchen [162]. Hierbei werden den Tieren bereits MOG-Spezifische pathogene T-Zellen injiziert. Diese Methode eignet sich besonders um auftretende Effekte einer bestimmten T-Zell-Population zuzuordnen. Im Falle der *Trpm7*-Kinase-defizienten Mäusen ist das die T<sub>H</sub>17 Population. Die MOG-spezifischen T-Zellen werden *in vitro* in T<sub>H</sub>17-

Zellen differenziert und direkt in die Versuchstiere injiziert [163]. So lassen sich direkte Rückschlüsse auf Interaktionsmechanismen zwischen Immunzellen ziehen.

### 3.5 Zielsetzung

Der Einfluss der TRPM7-Kinase bei der Graft *versus* Host Erkrankung lässt vermuten, dass die Kinase auch bei anderen Krankheiten, besonders Autoimmunerkrankungen, eine wichtige Rolle spielt. Gerade im Hinblick auf Erkrankungen wie die MS, bei der  $T_H17$ -Zellen eine entscheidende Rolle in der Progression der Erkrankung spielt, ist die TRPM7-Kinase eine Zielstruktur von besonderem Interesse. Durch die Beteiligung am TGF- $\beta$  Signalweg über die Modulation der SMAD2 Phosphorylierung ist die TRPM7-Kinase das Zünglein an der Waage in der Polarisation der T-Lymphozyten. Die TRPM7-Kinase ermöglicht hierbei das Verhältnis der  $T_{reg}/T_H17$  Zellen zugunsten der anti-inflammatorischen regulatorischen T-Zellen zu verschieben.

In dieser Arbeit soll das für die MS bekannte Mausmodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis in unserer TRPM7-Kinase-defiziente Mauslinie etabliert werden. Um einen Eindruck zur Durchführbarkeit zu erlangen, wird zunächst die einfachste Form der EAE, die aktive Variante, angewandt. Gleichzeitig wird der Einfluss der TRPM7-Kinase in der Entstehung und Progression der EAE überprüft. Mittels einer TRPM7-Kinase-defizienten Mauslinie wird direkt einen Vergleich zu Wildtyp-Tieren ermöglicht. Dabei sollen Daten sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* erhoben werden. Hierbei sollen für die Beobachtungen *in vivo* alle klinischen Symptome notiert werden. Im Verlauf des Versuchs werden die Versuchstiere streng kontrolliert und der Grad der Symptome in Form eines Scores und eine eventuelle Gewichtveränderung festgehalten werden. *Ex Vivo* wird das zentrale Nervensystem, Gehirn und Rückenmark, entnommen, sowie die Milz als Kontrolle verwendet. Durch gezielte Färbungen nach verschiedenen Lymphozyten-Populationen wird mit Hilfe der Durchflusszytometrie geklärt inwiefern sich die Tiere der *Trpm7*<sup>+/+</sup> und *Trpm7*<sup>R/R</sup> in der Art und Anzahl an Lymphozyten-Populationen im ZNS unterscheiden. Ist die EAE in unserer Mauslinie etabliert und praktikabel, werden je nach evaluierten Daten, mit einer weiteren Methode zusätzliche Experimente durchgeführt. Dazu werden ebenfalls alle Beobachtungen *in vivo* und *ex vivo* erfasst.

Um den Mechanismen hinter dem Einfluss der Kinase auf die Differenzierung von T<sub>H</sub>17 Zellen, besser zu verstehen, soll eine Transkriptomanalyse helfen. Naive T-Lymphozyten werden aus *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäusen isoliert und diese *in vitro* unter entsprechenden Bedingungen kultiviert und differenziert. Früher Studien haben gezeigt, dass durch die Zugabe von IL-1 $\beta$  das Differenzierungsverhalten der *Trpm7<sup>R/R</sup>* in T<sub>H</sub>17 kompensiert werden kann [23]. Für *Trpm7<sup>+/+</sup>* Zellen scheint es aber keinen Unterschied zu machen, ob sie zur Differenzierung IL-1 $\beta$  zugefügt bekommen oder nicht. Das deutet daraufhin, dass das IL-1 $\beta$  Signal nur dann zum Tragen kommt, wenn keine Kinaseaktivität verfügbar ist. Daher werden für die Transkriptomanalyse vier verschiedene Differenzierungsbedingungen angewandt, *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* T-Zellen werden jeweils mit und ohne die Zugabe von IL-1 $\beta$  kultiviert.

Für eine potentielle Übertragung unserer Ergebnisse aus den Tierversuchen auf den Menschen soll überprüft werden, inwieweit TRPM7 in MS Patienten exprimiert ist. Dazu werden Lymphozyten aus dem Liquor akut erkrankter MS-Patienten isoliert. Mittels der Patch-Clamp Methode und TRPM7 spezifischer Bedingungen wird geprüft ob TRPM7 aktiv ist.

In Summe wollen wir feststellen ob und inwieweit TRPM7 an der Entwicklung und der Progression der multiplen Sklerose beteiligt ist und das Potential als neues pharmakologisches Ziel festzustellen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 2:** Auflistung aller für die Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien

| Produkt                                   | Hersteller                                                | Artikel Nummer |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------|
| <b>Agarose NEEO Ultra-Qualität</b>        | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                         | 2267.5         |
| <b>Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl)</b> | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten | 213330         |
| <b>Brefeldin A</b>                        | BioLegend San Diego, California,<br>Vereinigte Staaten    | 420601         |

|                                                            |                                                                |             |
|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Calciumchlorid <math>\text{CaCl}_2</math></b>           | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | C1016-100G  |
| <b>Cäsiumhydroxid Lösung (<math>\text{CsOH}</math>)</b>    | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | 232041      |
| <b>Collagenase D</b>                                       | Roche Diagnostic GmbH Mannheim,<br>Deutschland                 | 11088866001 |
| <b>D-(+)-Glucose</b>                                       | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | G8270-100G  |
| <b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>                             | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                              | 4720.4      |
| <b>DNase I Stock</b>                                       | Roche Diagnostic GmbH Mannheim,<br>Deutschland                 | 11284932001 |
| <b>Eisessig</b>                                            | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | A6283       |
| <b>Ethylendiamintetraessigsäure</b>                        | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | E6756       |
| <b>Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure</b>    | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                              | 3054.1      |
| <b>FcR-blocking reagents Mouse</b>                         | Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach,<br>Deutschland             | 130-092-575 |
| <b>HEPES</b>                                               | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | H3375       |
| <b>Invitrogen™ Trizol™ Reagent</b>                         | ThermoFisher, Waltham,<br>Massachusetts, Vereinigte Staaten    | 15596-026   |
| <b>Kalilauge 50%</b>                                       | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                              | 7949.1      |
| <b>Kaliumchlorid (<math>\text{KCl}_2</math>)</b>           | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | P9541-500G  |
| <b>Kaliumhydrogencarbonat (<math>\text{KHCO}_3</math>)</b> | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | 237205      |
| <b>Komplette Freund- Adjuvans KFA</b>                      | Becton Dickinson Difco™, Franklin<br>Lakes, Vereinigte Staaten | BD 263810   |
| <b>L-Glutaminsäure</b>                                     | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | G1251       |

|                                             |                                                                |              |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)</b>  | Merck KGaA, Darmstadt,<br>Deutschland                          | 7786-30-3    |
| <b>Mitomycin C</b>                          | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                              | 4150.1       |
| <b>Mycobacterium tuberculosis<br/>H37Ra</b> | Becton Dickinson Difco™, Franklin<br>Lakes, Vereinigte Staaten | BD 231141    |
| <b>Natriumazid</b>                          | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | S2002-5G     |
| <b>Natriumchlorid</b>                       | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                              | HN.00.2      |
| <b>Natriumhydroxid (NaOH)</b>               | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | S5881        |
| <b>Paraformaldehyd PFA</b>                  | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | 158127       |
| <b>Percoll</b>                              | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | P1644        |
| <b>Pertussis toxin</b>                      | listLabs Campbell, California,<br>Vereinigte Staaten           | #180         |
| <b>PMA/Ionomycin cocktail</b>               | BioLegend San Diego, California,<br>Vereinigte Staaten         | 423301       |
| <b>Poly-D-Lysin-hydrobromid</b>             | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | P6407-5MG    |
| <b>Roti®- Gelstain</b>                      | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                              | 3865.1       |
| <b>Salzsäure 20 %</b>                       | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                              | 4326.1       |
| <b>Saponin</b>                              | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | 47036-50G-F  |
| <b>Sucrose</b>                              | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | S7903-250G   |
| <b>TriplexIII (EDTA-2Na)</b>                | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | 1.08418.0100 |
| <b>Tris PUFFERAN 99,9 %, p.a.</b>           | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                              | 4855.2       |
| <b>Trypanblau</b>                           | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>Vereinigte Staaten      | T8154        |

#### 4.1.2 Puffer und Lösungen

**Tabelle 3:** Verwendete Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung

| <b>Puffer und Lösungen</b>                     | <b>Zusammensetzung</b>                                                                                                                  |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>0,1 % PDL Lösung</b>                        | 5 mg Poly-d-Lysin gelöst in 50 ml ddH <sub>2</sub> O                                                                                    |
| <b>10x ACK Erythrocytes Lysis Buffer</b>       | 1,5M Ammoniumchlorid<br>100 mM Kaliumhydrogencarbonat<br>1mM Triplex III<br>In ddH <sub>2</sub> O, pH auf 7,2 eingestellt und gefiltert |
| <b>50x TEA Buffer (1 L)</b>                    | 242 g Tris gelöst in 600 ml ddH <sub>2</sub> O<br>100 mM Essigsäure<br>50 mM EDTA pH 8,0                                                |
| <b>Cäsium Glutamat 0,2 M Stock Lösung</b>      | 0,2 M L-Glutaminsäure in ddH <sub>2</sub> O<br>mit CsOH pH-Wert einstellen                                                              |
| <b>EDTA 0,5 M pH 8,0</b>                       | 14,61 g EDTA in 30 ml ddH <sub>2</sub> O<br>Mit NaOH auf pH 8,0 einstellen und auf 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen              |
| <b>Externe Lösung mit 3mM CaCl<sub>2</sub></b> | 140 mM NaCl<br>2,8 mM KCl<br>10 mM HEPES-KOH<br>0,2 % (w/v) Glucose<br>3 mM CaCl <sub>2</sub>                                           |
| <b>HEPES Stock 1 M (mit Cs, Na, KOH)</b>       | 119,5 g HEPES in ddH <sub>2</sub> O<br>pH auf 7,2 einstellen mit entsprechender OH Lösung                                               |
| <b>Interne Lösung</b>                          | 120 mM Cesium Glutamat<br>10 mM HEPES-CsOH<br>8 mM NaCl <sub>2</sub><br>5 mM EDTA (in Cs-Glutamat)<br>10 mM EGTA (in Cs-Glutamat)       |
| <b>M7 Primer Mix 20 µM</b>                     | 20 µl Forward Primer [100 µM]                                                                                                           |

|                                |                                                                                                                                   |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                | 20 µl Reversed Primer [100 µM]<br>160 µl ddH <sub>2</sub> O                                                                       |
| <b>MACS Buffer</b>             | 0,5 % (w/v) BSA<br>2 mM EDTA<br>in DPBS, steril gefiltert                                                                         |
| <b>Percoll 100 %</b>           | 9 Teile(v/v) Percoll<br>1 Teil (v/v) 10x HPBBS                                                                                    |
| <b>Percoll 70 %</b>            | Percoll 100 % entsprechenden mit 1x PBS<br>verdünnt                                                                               |
| <b>Percoll 37 %</b>            | Percoll 100 % entsprechenden mit 1x PBS<br>verdünnt                                                                               |
| <b>Perm-Buffer</b>             | 2 % (v/v) FBS<br>0,05 % (w/v) Natriumazid<br>0,1 % (w/v) Saponine                                                                 |
| <b>PFA Lösung 4 % (100 ml)</b> | 80 ml DPBS auf 60 °C erhitzen<br>4 g PFA<br>1 M NaOH zugeben bis die Lösung klar ist,<br>abkühlen lassen und auffüllen auf 100 ml |

#### 4.1.3 Kits und Assays

**Tabelle 4:** Verwendete Kits

| <b>Produkt</b>                                             | <b>Hersteller</b>                                   | <b>Produkt Nummer</b> |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>EasySep™ human CD4<sup>+</sup> T-Cell Isolation Kit</b> | STEMCELL Technologies Inc.,<br>Vancouver Kanada     | 17952                 |
| <b>MyTaq Extract PCR-Kit (Meridian)</b>                    | BioCat GmbH, Heidelberg,<br>Deutschland             | Bio21127              |
| <b>Naïve CD4<sup>+</sup> T-Cell Isolation Kit, mouse</b>   | Miltenyi Biotec, Bergisch-<br>Gladbach, Deutschland | 130-104-453           |



#### 4.1.4 Zellkultur Media und Supplements

**Tabelle 5:** Verwendetest Medium und entsprechenden Supplements

| Produkt                                       | Hersteller                                             | Artikel Nummer |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------|
| <b>Penicillin-Streptomycin</b>                | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten | P4333          |
| <b>RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement</b> | Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States       | 61870044       |

#### 4.1.5 Zytokine

**Tabelle 6:** Verwendete Zytokine, mit entsprechender relevanter Zusatzinformation

| Zytokine                                                     | Klon     | Stock c    | Hersteller          | Cat#   |
|--------------------------------------------------------------|----------|------------|---------------------|--------|
| <b>Anti-mouse IFN-γ</b>                                      | XMG1.2   | 5 mg/ml    | Leinco Technologies | I-1119 |
| <b>Anti-mouse Interleukin 4</b>                              | 11B11    | 5mg/ml     | Leinco Technologies | I-1071 |
| <b>InVivoMab anti-mouse Interleukin 4</b>                    | 11B11    | 9,83 mg/ml | Bio X Cell          | BE0045 |
| <b>InVivoMab anti-mouse Interleukin 4</b>                    | 11B11    | 9,33 mg/ml | Bio X Cell          | BE0045 |
| <b>InVivoMab anti-mouse CD3ε</b>                             | 145-2C11 | 5,5 mg/ml  | Bio X Cell          | BP0001 |
| <b>InVivoMab anti-mouse IFN-γ</b>                            | XMG1.2   | 6,56 mg/ml | Bio X Cell          | BE0045 |
| <b>InVivoMab anti-mouse IFN-γ</b>                            | XMG1.2   | 7,32 mg/ml | Bio X Cell          | BE0045 |
| <b>Recombinant Mouse Interleukin 23 (carrier free)</b>       | -        | 50 µg/ml   | Bio X Cell          | 589002 |
| <b>Recombinant mouse Interleukin 6 (IL-6) (carrier free)</b> | -        | 100 µg/ml  | BioLegend           | 575702 |
| <b>Recombinant Mouse Interleukin-1β (carrier free)</b>       | -        | 100 µg/ml  | BioLegend           | 575102 |
| <b>Recombinant TGF β1 (carrier free)</b>                     | -        | 50 µg/ml   | BioLegend           | 763102 |

Alle Zytokine wurden in PBS mit 0,5 % (w/v) BSA rekonstituiert, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

#### 4.1.6 Primer

**Tabelle 7:** Primerpaar zur Genotypen-Bestimmung der Mäuse

| Primer          | 5'-3'                                 | Amplikon Größe |
|-----------------|---------------------------------------|----------------|
| <b>M7 Mouse</b> | <b>F-</b> AAT GGG AGG TGG TTT         | 205 bp         |
|                 | <b>R-</b> CTC AGA TCA CAG CTT ACA GTC |                |

#### 4.1.7 Antikörper und Isotypen Kontrolle

**Tabelle 8:** Isotypen-Kontrolle für die Verwendeten Antikörper

| Isotyp              | Konjugat     | Klon    | Hersteller | Cat#   |
|---------------------|--------------|---------|------------|--------|
| <b>Rat IgG1, κ</b>  | PE/Cyanine 7 | RTK2071 | BioLegend  | 400415 |
| <b>Rat IgG2a, κ</b> | APC          | RTK2758 | BioLegend  | 400511 |
| <b>Rat IgG2b, κ</b> | PE           | RTK4530 | BioLegend  | 400607 |

**Tabelle 9:** Alle Verwendeten Antikörper mit essentiellen Angaben

| Spezifität              | Konjugat                 | Klone  | Isotyp       | Hersteller | Cat#   |
|-------------------------|--------------------------|--------|--------------|------------|--------|
| <b>Anti-mouse CD 19</b> | PerCP-Cy5.5              | 6D5    | Rat IgG2a, κ | BioLegend  | 115531 |
| <b>Anti-mouse CD 19</b> | Brilliant violet<br>605™ | 6D5    | Rat IgG2a, κ | BioLegend  | 115539 |
| <b>Anti-Mouse CD 4</b>  | APC                      | GK1.5  | Rat IgG2b, κ | BioLegend  | 100412 |
| <b>Anti-Mouse CD 4</b>  | FITC                     | GK1.5  | Rat IgG2b, κ | BioLegend  | 100406 |
| <b>Anti-mouse CD 4</b>  | Brilliant violet<br>605™ | RM 4-5 | Rat IgG2a, κ | BioLegend  | 100548 |
| <b>Anti-mouse CD 4</b>  | PE                       | GK1.5  | Rat IgG2b, κ | BioLegend  | 100407 |
| <b>Anti-mouse CD 45</b> | PerCP Cy 5.5             | 30-F11 | Rat IgG2b, κ | BioLegend  | 103131 |

|                                                      |                                   |           |              |                |            |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------|--------------|----------------|------------|
| <b>Anti-mouse CD 45</b>                              | PerCP                             | 30-F11    | Rat IgG2b, κ | BD Biosciences | 557235     |
| <b>Anti-mouse CD 45</b>                              | eFluor 450                        | 30-F11    | Rat IgG2b, κ | eBioscience    | 48-0451-80 |
| <b>Anti-mouse IFN<math>\gamma</math></b>             | PE-Cy 7                           | XMG1.2    | Rat IgG1, κ  | BioLegend      | 505825     |
| <b>Anti-mouse IFN<math>\gamma</math></b>             | PerCP-5.5                         | XMG1.2    | Rat IgG1, κ  | BioLegend      | 505821     |
| <b>Anti-mouse IL-10</b>                              | PE                                | JES5-16E3 | Rat IgG2b, κ | BioLegend      | 505007     |
| <b>Anti-mouse Ly6G</b>                               | APC                               | 1A8       | Rat IgG2a, κ | BioLegend      | 127613     |
| <b>Anti-mouse TCR V<math>\alpha</math>3.2</b>        | FITC                              | RR3-16    | Rat IgG2b, κ | BioLegend      | 135403     |
| <b>Anti-mouse TCR V<math>\alpha</math>3.2</b>        | PE                                | RR3-16    | Rat IgG2b, κ | BioLegend      | 135405     |
| <b>Anti-mouse TCR V<math>\beta</math>11</b>          | PE                                | RR3-15    | Rat IgG2b, κ | BioLegend      | 139003     |
| <b>Anti-mouse/human B220</b>                         | PerCP Cy5.5                       | RA3-6B2   | Rat IgG2a, κ | BioLegend      | 103235     |
| <b>Anti-mouse/human CD 11b</b>                       | Alexa Fluor <sup>®</sup> 700      | M1/70     | Rat IgG2b, κ | BioLegend      | 101222     |
| <b>Anti-mouse/human CD 11b</b>                       | eFluor 450                        | M1/70     | Rat IgG2b, κ | eBioscience    | 48-0112-80 |
| <b>Anti-mouse/human CD4R/B220</b>                    | FITC                              | RA3-6B2   | Rat IgG2a, κ | BioLegend      | 103205     |
| <b>Anti-mouse/rat IL-17A</b>                         | APC                               | eBio17B7  | Rat IgG2a, κ | eBioscience    | 17-7177-81 |
| <b>Zombie Aqua<sup>™</sup> Fixable Viability Kit</b> | Brilliant Violet 510 <sup>™</sup> | -         | -            | Biolegend      | 423101     |
| <b>Zombie UV<sup>™</sup> Fixable Viability Kit</b>   | DAPI                              | -         | -            | BioLegend      | 423107     |

#### 4.1.9 Haltungsbedingungen der Versuchstiere

Alle Tierversuche, die für diese Arbeit vorgenommen wurden, stehen im Einklang mit dem EU-Tierschutzgesetz und wurden im Vorfeld von den örtlichen Tierschutzbehörden genehmigt (AZ: 55.2-2532-Vet\_02-17-233 der Regierung Oberbayern). Die Tiere wurden in der Tierhaltung des Walther-Straub-Instituts für Pharmakologie und Toxikologie gezüchtet sowie gehalten. Alle Mäuse wurden in IVC-Käfigen (individual-ventilated-cages) gehalten, die in einem wöchentlichen Turnus gewechselt wurden. In der Tierhaltung herrscht ein 12 Stunden-Hell/Dunkel-Zyklus durch eine künstliche Beleuchtung, sowie eine Temperatur von 22 +/- 1°C und eine Luftfeuchtigkeit von 50 +/- 5 %. Um das Wohlbefinden der Tiere zu verbessern, wurden den Käfigen Einstreu und Holzwohle zugesetzt. Zuchtpaaren stand Mehrkornfutter Ssniff M-Z, allen anderen Tieren „Erhaltungs“ Futter Ssniff R/M-H, sowie Leitungswasser mit 20,4 mg/l Mg<sup>2+</sup>, 79,6 mg/l Ca<sup>2+</sup> und <0,2 mg/l Zn<sup>2+</sup> ad libitum zur Verfügung. Alle Futtermittel wurden von der Ssniff GmbH, Deutschland bezogen. Die Tiere wurden im Alter von drei Wochen von ihren Eltern entwöhnt und unter oben genannten Bedingungen gehalten. Geschwister gleichen Geschlechts wurden zusammen gehalten unter Berücksichtigung der maximalen Belegung von 5 Tieren pro Käfig.

#### 4.1.10 Mauslinien

Es wurden zwei unterschiedliche Mauslinien verwendet: #68 *Trpm7* R/R\_FoxP3 (JAX Laboratory Strain #006772 B6-Foxp3<sup>EGFP</sup>, J Immunol 178(5):2961-72, Nat Immunol 8(4):359-68) und #25c T7-R KI, die jeweils einen genetischen C57BL/6 Hintergrund haben. Beide Mauslinien tragen Homozygot die gleiche Single-Punktmutation am Exon 33, bei der durch einen Nukleotiden-Austausch von A zu G, der zu einer Aminosäuresubstitution von Lysin zu Arginin (Position K1646R) führt, und so zu einer Inaktivierung der Kinasefunktion bewirkt.

Beide Linien wurden heterozygot gezüchtet, wodurch drei Genotypen *Trpm7*<sup>+/+</sup>, *Trpm7*<sup>+/R</sup> und *Trpm7*<sup>R/R</sup> entstehen.

#### 4.1.11 Geräte und Laborausstattung

**Tabelle 10:** Liste aller benötigter Gerätschaften

| <b>Gerät</b>                                                       | <b>Hersteller/Vertrieb</b>                                        |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <b>BD LSRFortessa™ Cell Analyzer</b>                               | Becton Dickison GmbH Bioscience,<br>Heidelberg, Deutschland       |
| <b>Biofuge Stratus Heraeus Zentrifuge</b>                          | ThermoFisher, Waltham, Massachusetts,<br>Vereinigte Staaten       |
| <b>Cytika EPS 301 power supply</b>                                 | ThermoFisher, Waltham, Massachusetts,<br>Vereinigte Staaten       |
| <b>Dampfdruck Osmometer Vapro 5600</b>                             | Kreienbaum Neoscience GmbH, Langenfeld,<br>Deutschland            |
| <b>Digitaler Blockheizer SA-D 1100</b>                             | PEQLAB., Erlangen, Deutschland (heute<br>VWR)                     |
| <b>EasyPet® 2</b>                                                  | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                                |
| <b>EasySep™ Magnet</b>                                             | STEMCELL Technologies Inc., Vancouver,<br>Kanada                  |
| <b>Faraday Käfig</b>                                               | HEKA Elektronik GmbH, Reutlingen,<br>Deutschland                  |
| <b>Five easy Plus pH meter FP20</b>                                | Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland                          |
| <b>Freezer -80 °C</b>                                              | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                                |
| <b>Galaxy® 170 R/S CO<sub>2</sub> Inkubator, New<br/>Brunswick</b> | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                                |
| <b>Guava® easyCyte 5 Flow cytometer</b>                            | Merck Millipore, Burlington, Massachusetts,<br>Vereinigte Staaten |
| <b>IKA MS3basic Vortexer</b>                                       | IKA®-Werke GmbH & CO KG, Staufen,<br>Deutschland                  |
| <b>Inverses Mikroskop Axio Vert.A1</b>                             | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland                            |
| <b>Kompaktabsaugsystem AC 02/04</b>                                | Hettich Benelux B.V., Geldermalsen,<br>Niederlande                |
| <b>LED-Beleuchtungssystem Colibri 2</b>                            | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland                            |
| <b>Micromanipulator Patch Star</b>                                 | Scientifica, Uckfield, Vereinigtes Königreich                     |

|                                                |                                                                 |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>Multichannel Pippette 300 µl</b>            | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                              |
| <b>Neubauer Zählkammer</b>                     | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                               |
| <b>Patch Clamp Amplifier EPC-10</b>            | HEKA Elektronik GmbH, Reutlingen, Deutschland                   |
| <b>PCR-Thermocycler FlexCycler<sup>2</sup></b> | Analytikjena, Jena, Deutschland                                 |
| <b>PerfectBlue Gelsystem</b>                   | PEQLAB., Erlangen, Deutschland (heute VWR)                      |
| <b>Pipette 1000 µl</b>                         | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                              |
| <b>Pipetten 10 µl</b>                          | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                              |
| <b>Pipetten 100 µl</b>                         | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                              |
| <b>Pipetten 2 µl</b>                           | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                              |
| <b>Pipetten 20 µl</b>                          | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                              |
| <b>Pipetten 200 µl</b>                         | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                              |
| <b>Primovert, inverses Mikroskop</b>           | Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, Deutschland |
| <b>Puller DMZ-Universal</b>                    | Zeitz-Instrumente Vertriebs GmbH, Martinsried, Deutschland      |
| <b>QuadroMACS™ Separator</b>                   | Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland                 |
| <b>Sicherheitswerkbank SWB 101904007</b>       | Berner International GmbH, Elmshorn, Deutschland                |
| <b>Thermomix Compact</b>                       | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                              |
| <b>Wasserbad</b>                               | Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland                    |
| <b>Zentrifuge 5424R</b>                        | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                              |

#### 4.1.12 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 11:** Aufzählung der verwendeten Verbrauchsmittel

| <b>Verbrauchsmittel</b> | <b>Hersteller</b>                 | <b>Artikelnummer</b> |
|-------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| <b>20 ml Spritzen</b>   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland | 0059.1               |

|                                                          |                                                          |              |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Biosphere Tips 100 µl</b>                             | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland         | 70.760.212   |
| <b>Biosphere Tips 1000 µl</b>                            | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland         | 70.3050.255  |
| <b>Biosphere Tips 20 µl</b>                              | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland         | 70.114.210   |
| <b>Borosilikat Glas mit<br/>Filament, Feuerpoliert</b>   | Science Products GmbH, Hofheim<br>am Taunus, Deutschland | GB 150 TF-8P |
| <b>Deckglas Ø 24 mm</b>                                  | neoLab Migge GmbH, heidelberg,<br>Deutschland            | WQ-0695      |
| <b>Deckgläser Ø 12mm</b>                                 | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        | P.231.1      |
| <b>DNA LoBind Tube 1,5 ml</b>                            | Eppendorf AG, Hamburg,<br>Deutschland                    | 0030 108.051 |
| <b>Einmal-Kanüle Sterica® 21 G,<br/>Gr. 2, B. Braun</b>  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        | X127.1       |
| <b>Einmal-Kanüle Sterica® 26 G,<br/>Gr. 18, B. Braun</b> | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        | C718.1       |
| <b>Einmalspritzen, Luer-Lock 10<br/>ml, B. Braun</b>     | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        | 0058.1       |
| <b>Einmalspritzen, Luer-Lock 5<br/>ml, B. Braun</b>      | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        | 0057.1       |
| <b>Filtropur S 0,45</b>                                  | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland         | 83.1826      |
| <b>LS Columns</b>                                        | Miltenyi Biotec, Bergisch-<br>Gladbach, Deutschland      | 130-042-041  |
| <b>Multiply PCR Gefäße 0,2 ml</b>                        | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland         | 72.737.002   |
| <b>Neubauer Kammer</b>                                   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        | 06.400.10    |
| <b>Pasteur Pipetten ohne<br/>Wattestopfen</b>            | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        | 4522.1       |
| <b>PCR-Reagiergefäß 8er</b>                              | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                        | CK84.1       |

|                                                          |                                                  |             |
|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------|
| <b>Pipettenspitzen 1000 µl</b>                           | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 70.3050     |
| <b>Pipettenspitzen 1250 µl</b>                           | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 70.1186     |
| <b>Pipettenspitzen 20 µl</b>                             | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 70.1116     |
| <b>Pipettenspitzen 200 µl</b>                            | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 70.760.002  |
| <b>Reagiergefäße 0,5 ml</b>                              | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 72.699      |
| <b>Reagiergefäße 1,5 ml</b>                              | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 72.690.001  |
| <b>Reagiergefäße 2,0 ml</b>                              | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 72.691      |
| <b>Schraubröhre, 15 ml</b>                               | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 62.554.502  |
| <b>Schraubröhre, 50 ml</b>                               | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 62.547.254  |
| <b>Serologische Pipette,<br/>wattiert, steril, 10 ml</b> | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 86.1254.001 |
| <b>Serologische Pipette,<br/>wattiert, steril, 25 ml</b> | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 86.1685.001 |
| <b>Serologische Pipette,<br/>wattiert, steril, 5 ml</b>  | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 86.1253.001 |
| <b>TC-Platte 12 Well Standard F</b>                      | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 83.3921     |
| <b>TC-Platte 48 Well Suspens F</b>                       | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 83.3923.500 |
| <b>TC-Platte 6 Well Standard F</b>                       | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 83.3920     |
| <b>TC-Platte 96 Well Suspens K</b>                       | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 83.3926.500 |



|                                                           |                                                  |             |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------|
| <b>TC-Platte 96 Well Suspens R</b>                        | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 83.3925.500 |
| <b>TC-Schale 35 Standard</b>                              | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 83.3900     |
| <b>Transferpipette 6ml</b>                                | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 86.1174     |
| <b>Vasco Sensitive S (glove)</b>                          | B. Braun SE, Melsungen,<br>Deutschland           | 6067500     |
| <b>Wescor Sample Discs SS-033</b>                         | Fisher Scientific GmbH, Schwerte,<br>Deutschland | 13484860    |
| <b>Zellkulturflasche, T-25,<br/>Standard, Filterkappe</b> | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 83.3910.002 |
| <b>Zellsiebadapter</b>                                    | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 83.394.999  |
| <b>Zellsiebe 100 µm</b>                                   | Sarstedt GmbH & Co KG,<br>Nümbrecht, Deutschland | 83.3945.100 |

#### 4.1.13 Software

**Tabelle 12:** Verwendete Software

| <b>Software</b>                                      | <b>Hersteller/Vertrieb</b>                                                              |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>BioRender</b>                                     | BioRender, Toronto, Kanada                                                              |
| <b>FitMaster 2x53</b>                                | HEKA Elektronik GmbH, Reutlingen, Deutschland                                           |
| <b>Flowjo v10</b>                                    | BD (Becton, Dickinson and Company), New Jersey, USA                                     |
| <b>GraphPad PRISM 9</b>                              | GraphPad Software inc., San Diego, USA                                                  |
| <b>Guava InCyte</b>                                  | Luminex Corporation, Austin, USA                                                        |
| <b>Igor Pro 6.2.2.2</b>                              | WaveMetrics, Inc., Portland, USA                                                        |
| <b>Patch Master 2x69</b>                             | HEKA Elektronik GmbH, Reutlingen, Deutschland                                           |
| <b>TAC (Transcriptome Analysis Console Software)</b> | Appliedbiosystem by ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten |
| <b>Zen 2 Pro 2.0.0.0</b>                             | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland                                                  |

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten werden unter Sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Zellen werden in RPMI Medium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle Reagenzien und Medien, die für die Versorgung verwendet werden, werden vor Verwendung auf 37°C erwärmt.

#### 4.2.1.1 Jurkat Zelllinie

Diese Zellen sind eine immortalisierte humane Linie von T-Lymphozyten. Zur Kultivierung wird das Medium mit 10 % FBS und 1 % Streptomycin-Penicillin ergänzt. Die allgemeine Haltung der Zellen erfolgte in TC-25 Flaschen, die im Stand kultiviert werden. Die Zellen werden, je nach Nutzung, alle drei bis vier Tage geteilt. Dazu wird eine entsprechende Menge der Zellsuspension (Verhältnis 1:10 – 1:20) in eine mit Medium vorgefüllten TC-25 Flasche überführt.

#### 4.2.1.2 Primäre Lymphozyten (Maus)

Zur Kultivierung werden die aus Organen isolierten Lymphozyten in Medium mit 10 % FBS gegeben. Die Zellen werden in Titerplatten unterschiedlicher Größen gehalten (6 – 24 Well). Die Zellen werden nicht länger als 10 Tage in Kultur gehalten und bei Bedarf 1:2 - 1:3 auf neue Wells aufgeteilt, und das Volumen mit vorgewärmtem Medium aufgefüllt.

#### 4.2.1.3 Zellzahl-Bestimmung mittels Neubauerkammer

Die Bestimmung der Lebendzellzahl wird nach einer Färbung der Zellen mit Trypanblau mittels einer Neubauerkammer ausgezählt. Hierzu werden je Zellsuspension 10 µl entnommen und mit gleicher Menge Trypanblau gefärbt. Je vier der 25 Gruppenquadrate werden ausgezählt und eine Zellkonzentration pro Milliliter berechnet.

### 4.2.2 Mäusezucht der genmodifizierten Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendete Mauslinien wurden mit heterozygoten Elternpaaren gezüchtet. Die Würfe ergaben so drei unterschiedliche Genotypen, von denen ausschließlich

die homozygoten Tiere *Trpm7<sup>+/+</sup>* sowie *Trpm7<sup>R/R</sup>* für Versuche verwendet wurde. Die Tiere wurden im Alter zwischen 8 und 16 Wochen verwendet.

#### 4.2.2.1 Genotypisierung Maus

Zur Bestimmung des Genotyps der Mäuse wird die DNS aus den Ohrstanzen der entsprechenden Tiere nach Herstellerangabe des „MyTaq Extraction Kit“ isoliert, Pipettierschema siehe Tabelle 12. Um die Reaktion zu starten, wird die Probe bei 75°C im Heizblock für 5 min und im Anschluss zur Deaktivierung bei 95 °C für 10 min inkubiert.

**Tabelle 13:** Pipettierschema zur DNS Isolation aus Mäusegewebe

| 1x                      |            |
|-------------------------|------------|
| ddH <sub>2</sub> O [µl] | 70         |
| Puffer A [µl]           | 20         |
| Puffer B [µl]           | 10         |
| <b>Total [µl]</b>       | <b>100</b> |

Die isolierte DNS wird im Anschluss mittels PCR amplifiziert, Pipettierschema (Tabelle 12).

**Tabelle 14:** Pipettierschema zur Anfertigung eines Reaktionsansatzes

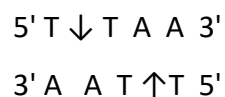
| 1x                       |           |
|--------------------------|-----------|
| ddH <sub>2</sub> O [µl]  | 7,5       |
| M7 Primer Mix 20 µM [µl] | 4         |
| Bioline My Taq [µl]      | 12,5      |
| Proben DNS [µl]          | 1         |
| <b>Total [µl]</b>        | <b>25</b> |

Die PCR wird mittels Nachstehender Konditionen durchgeführt (Tabelle 13).

**Tabelle 15:** PCR Programm

| Schritt                   | Temperatur | Zeit  | Zyklus |
|---------------------------|------------|-------|--------|
| Anfängliche Denaturierung | 95 ° C     | 3:00  | 1      |
| Denaturierung             | 95 ° C     | 00:15 | 5      |
| Primer Anlagerung         | 66 ° C     | 00:15 |        |
| Extension                 | 72 ° C     | 00:20 |        |
| Denaturierung             | 95 ° C     | 00:15 | 30     |
| Primer Anlagerung         | 55 ° C     | 00:15 |        |
| Extension                 | 72 ° C     | 00:20 |        |
| Extension                 | 72 ° C     | 05:00 | 1      |
| Abkühl Phase              | 8 ° C      | 60:00 | 20     |

Der anschließende Verdau der DNS-Fragmente gibt Aufschluss über den entsprechenden Genotyp. Das Restriktionsenzym Tru1 schneidet folgende DNS-Sequenz, die der des Wildtypen entspricht.



Durch den Einzelbasen Austausch in der Kinase-defizienten Maus von A zu G wird die DNS-Sequenz von dem Enzym nicht erkannt. Somit erhalten wir bei der finalen Gelelektrophorese eine Bande für *Trpm7<sup>R/R</sup>*, zwei Banden für *Trpm7<sup>+/+</sup>* und drei Banden für die Heterozygote *Trpm7<sup>+/R</sup>*.

Für den Verdau wird zu jeder Probe, direkt in das PCR Tube, nachfolgende Substanzen gegeben (Tabelle 15). Die Probe wird nun für weitere 20 h bei 65° C inkubiert.

**Tabelle 16:** Reaktionsansatz für eine Probe zum enzymatischen Verdau

|                             | 1x  |
|-----------------------------|-----|
| ddH <sub>2</sub> O [µl]     | 2,5 |
| 10x Puffer R [µl]           | 2   |
| Restriktionsenzym Tru1 [µl] | 0,5 |
| Total [µl]                  | 5   |

Für die Gelelektrophorese wird zunächst ein 3 % Agarose-Gel mit Roti-Gel-Stain gegossen. Für 1,5 h wird eine Spannung von 100 V angelegt. Die Banden werden mittels dem PeQlab detektiert und die Banden ausgewertet.

#### 4.2.4 Organentnahme und Zellisolation

Zur Organentnahme werden die Tiere mittels CO<sub>2</sub> getötet/betäubt und die benötigten Organe heraus präpariert.

##### 4.2.4.1 Lymphknoten

Die Lymphknoten werden mit der Rückseite eines 5 ml Spritzenkolben in einer TC 35 Platte zerkleinert, durch ein 100 µm Zellsieb gestrichen, in einem neuen 15 ml Falcon Röhrchen gesammelt. Die Schale wird zweimal mit 2 ml RPMI Medium gewaschen und ebenfalls durch das Zellsieb filtriert. Die Zellen werden nun bei 300 g, 4°C für 5 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in 2 ml Medium (RPMI, 10 % FBS) aufgenommen. Nach der Zellzahlbestimmung mittels einer Neubauerkammer werden die Zellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

##### 4.2.4.2 Milz

Die Milz wird ebenfalls mit der Rückseite eines 5 ml Spritzenkolben in einer TC 35 Platte zerkleinert, zweimal mit 2 ml RPMI Medium gewaschen und direkt bei 300g, 4°C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Gewebepellet in 4 ml 1x ACK Puffer resuspendiert und für 1,5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Erythrolysereaktion wird durch die Zugabe von 8 ml RPMI + 10%FBS gestoppt. Die Zellsuspension wird nun durch ein

100 µm Zellsieb in ein frisches 15 ml Falcon Röhrchen gefiltert, bei 300 g, 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet in 5 ml RPMI + 10% FBS aufgenommen. Nach der Zellzahlbestimmung mittels einer Neubauerkammer werden die Zellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

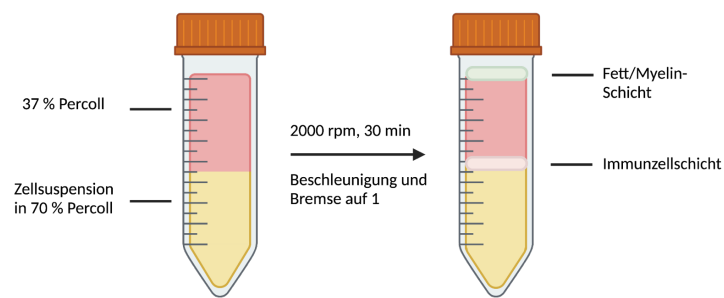
#### *4.2.4.3 Zentrales Nervensystem (ZNS)*

Um das ZNS herauszupräparieren müssen die Mäuse nach der CO<sub>2</sub>-Betäubung mit PBS perfundiert werden, um das Blut aus dem Kreislauf zu fluten. Hierzu wird zunächst ein Schnitt im rechten Vorhof gemacht, um das Abfließen des Blutes zu gewährleisten. Die Perfusionsnadel wird in den linken Ventrikel eingeführt und dabei darauf geachtet, nicht zu weit nach hinten zu stechen. Nun wird vorsichtig PBS injiziert. Die Perfusion verläuft richtig, wenn sich die gut durchbluteten Organe langsam heller färben.

Nach Eröffnung des Schädels wird das Gehirn vorsichtig herauspräpariert und in TC-35 Petrischale mit 2 ml RPMI Medium (kein FBS) auf Eis überführt. Das Rückenmark wird mit Hilfe einer 20G Nadel und einer mit 10 ml PBS gefüllter Spritze aus der Wirbelsäule gespült und ebenfalls in die Petrischale überführt. Das Gewebe wird in kleine gleichmäßige Teile zerschnitten. Für einen Verdau werden Kollagenase D (3,75 mg/ml) und DNase I (1,25 mg/ml) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Das Gewebe wird im Anschluss mit dem Kolben einer 5 ml Spritze zerdrückt, durch ein 100 µm Zellsieb gefiltert und in einem 50 ml Falcon Röhrchen gesammelt. Die Petrischale wird mit insgesamt 20 ml RPMI gewaschen. Die Zellsuspension wird bei 300 g, 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Um die Lymphozyten aus der Zellmasse zu isolieren, wird eine Dichtegradientenzentrifugation angewandt. Das Zellpellet wird nun in 5 ml 70 % Percoll resuspendiert und in ein frisches 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Nun wird langsam und vorsichtig 5 ml 37 % Percoll darauf gegeben. Es ist zwingend erforderlich darauf zu achten, dass sich die Flüssigkeiten nicht mischen, um eine saubere Trennung der Zellsubpopulationen zu gewährleisten. Die Trennung Erfolg bei einer Zentrifugation bei 650 g, Raumtemperatur für 30 min. Um eine Vermischung der beiden Schichten zu verhindern werden Beschleunigung und Bremse auf einen Wert von 1 gesetzt.

Nach der Zentrifugation haben sich die mononuklearen Zellen in der Mitte als Ring abgesetzt.



**Abbildung 4: Isolation von Lymphozyten mittels Dichtezentrifugation.** Die Abbildung zeigt schematisch die verschiedenen Schichten vor und nach der Dichtezentrifugation mittels Percoll unterschiedlicher Konzentrationen. Die Zellsuspension wird in der Percolllösung mit höherer Viskosität aufgenommen und mit Percoll geringerer Dichte überlagert. Nach der Zentrifugation befinden sich die Lymphozyten in einer Schicht zwischen den Percollösungen.

Mit einer 1000 µl Pipettenspitze wird in die oberste Schicht aus Fett ein Loch gestochen, die mononuklearen Zellen mittels einer Transferpipette aufgenommen und in ein neues 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wird mit 12 ml kompletten RPMI gewaschen um das restliche Percoll zu entfernen. Die Proben werden bei 4°C, 350g für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 500 µl kompletten RPMI Medium aufgenommen. Es sind Zellzahlen von  $0,1 - 0,5 \times 10^6$  für Gesunde Mäuse sowie  $0,3 - 3 \times 10^6$  für kranke Mäuse zu erwarten.

#### 4.2.5 EAE- Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Für die Versuche werden Mäuse im Alter von 7-20 Wochen verwendet. Dabei wird auf eine ausgeglichene Altersverteilung innerhalb der Versuche zwischen WT und KI geachtet. Pro Versuch werden maximal 12 Tiere verwendet, die entweder den Genotyp *Trpm7<sup>+/+</sup>* oder *Trpm7<sup>R/R</sup>* haben. Die Tiere werden nach der Immunisierung ab dem 5. Tag täglich kontrolliert. Dabei wird das Gewicht, die äußere Erscheinung und die Motorik der Mäuse dokumentiert. Bei beginnenden motorischen Einschränkungen werden den Tieren entsprechende Scores zugordnet. Dies wird in zwei unterschiedlichen Kategorien vergeben, die innerhalb des Tierversuchsantrag festgelegt sind (Tabelle 16 und 17). (Kategorie 1: versuchsspezifischer Score sowie Kategorie 2: allgemeiner Score).

Die Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes geplant und durchgeführt und von der Tierethikkommission der Regierung von Oberbayern in Übereinstimmung mit den europäischen Richtlinien genehmigt.

**Tabelle 17:** Kategorisierung und Definition der Belastungsgrade der Tiere im EAE Versuch (Kategorie 1)

| <b>Grad</b> | <b>Klinische Anzeichen</b>                                                                        | <b>Belastung</b> | <b>Maßnahmen</b>                                                                                              |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>0</b>    | Normal, keine offensichtlichen Krankheitsanzeichen                                                | keine            | • keine                                                                                                       |
| <b>0.5</b>  | Tonusverlust im Schwanz, aber noch nicht gelähmt                                                  | gering           | • Beginn der Aufzeichnung des klinischen Grads der EAE und des Gewichts                                       |
| <b>1</b>    | Gelähmter Schwanz – Maus kann nicht auf den Rücken gedreht werden                                 | gering           | • „Lähmung“-Schild wird am Käfig angebracht<br>• Mäuse werden täglich beobachtet                              |
| <b>1.5</b>  | Gelähmter Schwanz – Maus kann auf den Rücken gedreht werden, kommt sofort in Ausgangslage zurück  | gering           |                                                                                                               |
| <b>2</b>    | Gelähmter Schwanz – Maus kommt nach Drehung auf den Rücken mit Verzögerung in Ausgangslage zurück | mittel           | • Nassfutter am Käfigboden in Petrischale<br>• Wasserflasche mit längerem Aufsatz<br>• extra Nistmaterial     |
| <b>2.5</b>  | Partielle Hinterbeinschwäche                                                                      | mittel           |                                                                                                               |
| <b>3</b>    | Hinterbeinparalyse, aber Fortbewegung möglich                                                     | schwer           | • bei guter Mobilität und Futter-/ Wasseraufnahme (allg. score $\leq 2$ ) max. 7 Tage bis zur Tötung*         |
| <b>3.5</b>  | Vollständige Hinterbeinparalyse, Schwäche in den Vorderbeinen                                     | schwer           | • bei schlechter Mobilität und Futter-/ Wasseraufnahme (allg. score $\geq 3$ ) Tötung nach max. 24h           |
| <b>4</b>    | Parese aller Extremitäten                                                                         | schwer           | • ab einem Grad von 4.0 werden die Mäuse sofort aus dem Versuch genommen und mittels CO <sub>2</sub> getötet. |
| <b>5</b>    | Moribund durch EAE                                                                                | schwer           |                                                                                                               |



**Tabelle 18:** Einteilung des Allgemeinzustandes der Tiere (Kategorie 2)

| <b>Beobachtung</b>                 | <b>Parameter</b>                                                                                                                                                                      | <b>Score</b> |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <i>Verhalten</i>                   | Eingeschränkte oder überhöhte Aktivität, Ruhelosigkeit                                                                                                                                | <b>1</b>     |
|                                    | Kauerhaltung, Leib aufgezogen, teilweises Absondern von der Gruppe, bewegt sich reduziert                                                                                             | <b>2</b>     |
|                                    | Apathisch, keine Reaktion oder Aggressivität beim Handling, stark eingeschränkte Bewegung, Isolation, Stereotypien                                                                    | <b>3</b>     |
| <i>Aussehen</i>                    | Mattes Fell, Fellpflege eingeschränkt, Lidspalte enger                                                                                                                                | <b>1</b>     |
|                                    | Leicht gestäubtes Fell, Lidspalte eng, Augen trüb, verklebte Körperöffnungen, Diarrhoe                                                                                                | <b>2</b>     |
|                                    | Struppiges, stumpfes Fell, Lider geschlossen, Bulbus eingesunken, gekrümmter Rücken, Flanken eingefallen                                                                              | <b>3</b>     |
|                                    | Hautläsionen < 2 cm <sup>2</sup> , offenen Wunden < 1 cm <sup>2</sup> , Prolaps von Rektum/ Penis/ Vagina                                                                             | <b>2</b>     |
|                                    | Offensichtliche schwere Verletzungen oder Knochenbrüche, Hautläsionen > 2 cm <sup>2</sup> , offenen Wunden > 1 cm <sup>2</sup> , verletzter/ wunder Prolaps von Rektum/ Penis/ Vagina | <b>3</b>     |
|                                    | Deutlich sichtbare Tumore                                                                                                                                                             | <b>3</b>     |
|                                    |                                                                                                                                                                                       |              |
| <i>Körpergröße und Entwicklung</i> | 1/3 – 2/3 Körpergewicht im Vergleich zu den Geschwistern bzw. „Body Condition Score“ (BCS) 2, BCS 5                                                                                   | <b>2</b>     |
|                                    | <1/3 Körpergewicht im Vergleich zu den Geschwistern bzw. BCS1                                                                                                                         | <b>3</b>     |
|                                    |                                                                                                                                                                                       |              |

Die Tiere, die für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche verwendet wurden, wurden maximal bis zu einem Score von 3 in der Kategorie 1 im Versuch gehalten. Spätestens bei Erreichen des maximalen Scores wurden die Tiere mittels CO<sub>2</sub> betäubt und die Organe zur weiteren Analyse entnommen.

Auch das allgemeine Wohlbefinden der Tiere wurde kontrolliert. Keines der Tiere musste vorzeitig aus dem Versuch genommen werden.

#### 4.2.5.1 aktive EAE

Die Mäuse werden für die aktive EAE mittels einem körpereigenem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG-Protein) immunisiert. Hierfür wird eine Emulsion hergestellt, die aus einem kompletten Freund's Adjuvans und dem Antigen bestehen. Am Tag der Immunisierung

werden die Tiere gewogen und das Anfangsgewicht notiert. Den Tieren wird je 200 µl der Emulsion subkutan an der desinfizierten Schwanzbasis injiziert. Zusätzlich wird den Tieren intraperitoneal 200 µl Pertussis Toxin injiziert und eine weitere Injektion erfolgte 48 h später. In Versuch 1 wurde den Tieren je 150 ng injiziert, im Versuch 2 nur noch 100 ng. Aufgrund der starken Reaktion auf die Immunisierung im Ersten Versuch wurde im Zweiten auf die zweite Injektion des Pertussis Toxins verzichtet. Die Emulsion wird mit einer 25 G Kanüle, die intraperitoneale mittels einer 27 G Kanüle verabreicht.

Die Immunisierung der Mäuse wurde unter meiner Assistenz von meinen Kooperationspartnern Dr. Anneli Peters sowie Dr. Anna Thomann (Institut für klinische Neuroimmunologie, BMC, LMU) durchgeführt.

#### *4.2.5.2 passive EAE*

Für die passive EAE wird den Tieren bereits MOG-spezifische T<sub>H</sub>17 Zellen injiziert. Hierzu wird die Mauslinie (gezüchtet und gehalten am BMC der Arbeitsgruppe Peters) **OSE** (C57BL/6-Tg(Tcra2D2,Tcrb2D2)1Kuch/J x B6.129-Igh<sup>tm1(8.18C5)</sup>Wek) verwendet. Diese tragen MOG-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die aus Milz und Lymphknoten isoliert werden.

Die Zellen werden wie unter 4.2.7.1 beschrieben differenziert. Anstelle von Mitomycin C wurden die APC mittels Bestrahlung inaktiviert. Die Zellen werden im Anschluss an die beschriebenen Schritte weiter bis Tag 10 differenziert. Hierzu werden die Zellen an Tag 4 im Verhältnis 2:3 gesplittet und jedes Well wieder auf ein Gesamtvolumen von 1,5/ 3 ml mit Medium ( $\alpha$ INF $\gamma$  und rIL-23 je c<sub>fresh</sub> 10ng/ml) aufgefüllt.

An den Tagen 5 und 7 werden je 1/3 des Volumens abgenommen und durch frisches Medium ( $\alpha$ INF $\gamma$  c<sub>fresh</sub> 5ng/ml) ersetzt. An Tag 7 werden zusätzlich rIL-23 (c<sub>fresh</sub> 10ng/ml) zugegeben.

Die Zellen werden am nächsten Tag gesammelt und gezählt und zur Restimulation vorbereitet. Dazu werden 6-Well Platten mit CD3 $\epsilon$  und CD28 (je c<sub>final</sub> 4,0 µg/ml) in PBS für 1,5 h bei 37°C beschichtet, und die Zellen in Medium ausgesät. Am 10. Tag werden die differenzierten T-Zellen gesammelt und dreimal mit PBS gewaschen. Der Differenzierungserfolg der Zellen wird mittels Zytokinfärbung IL-17A (siehe Punkt 4.2.6.2) überprüft, und die Zellen werden mit PBS auf eine Konzentration von 20 x 10<sup>6</sup> IL-17 produzierende Zellen pro ml eingestellte.

Den Mäusen werden je 200 µl der Zellsuspension intraperitoneal injiziert und die entsprechende Injektionsstelle im Vorfeld desinfiziert um Infektionen zu vermeiden.

Die Tiere wurden in den folgenden Tagen wie unter Punkt 4.2.5 beschrieben begutachtet und gewogen.

#### 4.2.6 Fluoreszenzfärbung und Messung mittels Durchflusszytometrie

Alle Messungen, die mehr als 4 Farben beinhalte, wurden am BMC mit dem BD System Fortessa durch Kooperationspartner gemessen. Kleinere Messungen, die mit weniger Farben auskommen, wurden mit dem Guava easyCyte in unseren Laboren durchgeführt.

##### *4.2.6.1 Zellstimulation für Zytokinfärbungen*

Die Zellstimulation erfolgt mittels PMA/Ionomycin 500x und dem Golgi-Stopp Brefeldin A 1000x. Die jeweilige Substanz wird auf eine einfache Konzentration mit dem entsprechenden Medium verdünnt und die Zellen darin aufgenommen. Nach 4 h bei 37 °C im Zellinkubator werden die Zellen für die weitere Verwendung gesammelt.

##### *4.2.6.2 Fluoreszenzfärbung zur Messung am Durchflusszytometer*

Für die Messungen an einem Durchflusszytometer werden je nach Fragestellung verschiedene Färbungen durchgeführt. Die verschiedenen Farben sind unter dem Abschnitt Material aufgelistet. Der Lebend-/Tod-Nachweis wird mittels Farbstoffe der Kategorie Zombie unterschiedlicher Fluorochrome gemacht. Der Farbstoff sind nach Herstellerangaben in DMSO rekonstituiert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Für eine reine Oberflächenfärbung werden unstimulierte, für eine anschließende Zytokinfärbung, stimulierte Zellen verwendet.

Die Zellen werden zur Färbung in eine 96-Well Platte mit konischem Boden überführt und bei 300 g, 5 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Jede Probe wird in 50 µl Zombie Farbstoff (verdünnt 1:500 in PBS) resuspendiert und bei 4 °C im Dunklen für 20 min

inkubiert. Zu den Proben wird 180 µl MACS Puffer zugeben, und die Zellen 5 min, 300 g bei 4° C zentrifugiert, und der Überstand verworfen.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wird das Zellpellet in FcR-Block (1:10 in MACS Puffer) resuspendiert und für 15 min bei 4° C inkubiert.

Alle Oberflächenantikörper werden 1:200 in MACS Puffer verdünnt und 50 µl direkt auf die FcR-Block Zellsuspension gegeben, resuspendiert und für 20 min bei 4° C inkubiert. Zum Waschen wird direkt 180 µl MACS Puffer zugegeben und 5 min bei 300g und 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Um die Zellen zu fixieren, werden diese in 50 µl 0,4 % PFA Lösung resuspendiert, für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert, mit MACS Puffer gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Alle Proben, die nicht weiter gefärbt werden, werden in MACS Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen.

Alle weiteren Proben werden in 180 µl Perm-Puffer resuspendiert und abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in 50 µl MACS Puffer mit 1:100 verdünnter Antikörperlösung aufgenommen und 30 min, bei 4°C inkubiert. Im Anschluss werden 180 µl Perm-Puffer zugeben und abzentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit MACS Puffer, werden die Zellen, abhängig von der Zellzahl, in 100 -180 µl MACS Puffer aufgenommen und vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgt mittels Flowjo.

#### 4.2.7 Transkriptomanalyse T<sub>H</sub>17 differenzierter Zellen

Die RNA-Isolation sowie die Durchführung der MicroArray Analyse (Clariom™ D Assay, Mouse, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientifica) wurde durch die Firma ATLAS Biolabs GmbH, Berlin durchgeführt.

##### 4.2.7.1 T<sub>H</sub>17 Differenzierung unter verschiedenen Bedingungen

Zur Differenzierung werden die Lymphozyten von *Trpm7*<sup>+/+</sup> sowie *Trpm7*<sup>R/R</sup> Mäuse im Alter von 8 - 14 Wochen, aus Lymphknoten und Milz isoliert. Die naiven CD4<sup>+</sup> Zellen werden aus der Zellsuspension separiert (Miltenyi Biotec, naive CD4<sup>+</sup> T-Cell Isolation Kit, mouse). Alle anderen

Zellen (APCs) werden zur Stimulation der naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen inaktiviert. Hierzu werden die Zellen 30 min bei 37 °C in RPMI Medium mit 25 µg/ml Mitomycin C (500 µl/ 1x 10<sup>7</sup> Zellen) inkubiert und im Anschluss 4-mal mit Medium gewaschen.

Die Zellen werden je nach Menge in 6- oder 12 Well-Titerplatten ausgesät (Tabelle 17).

**Tabelle 19:** Zellzahl mit zugehörigem Verhältnis zum Stimulus für 6- oder 12 Well Titerplatten

| PLATTE         | CD4 <sup>+</sup> ZELLEN     | CD4 <sup>+</sup> :APCS | V <sub>GESAMT</sub> [ML] |
|----------------|-----------------------------|------------------------|--------------------------|
| <b>6-WELL</b>  | 3,0 - 4,0 x 10 <sup>6</sup> | 1:5                    | 3                        |
| <b>12-WELL</b> | 1,5 – 2,0 x 10 <sup>6</sup> | 1:5                    | 1,5                      |

Die Differenzierungsbedingungen sind für beide Genotypen gleich und werden mit und ohne IL-1β (c<sub>final</sub> 20 ng/ml) durchgeführt. Weiter Zytokine im Differenzierungsmedium sind: αCD3 (c<sub>final</sub> 2,5 µg/ml), αIL-4 (c<sub>final</sub> 10 µg/ml), TGF-β1 (c<sub>final</sub> 3 ng/ml), αINFγ (c<sub>final</sub> 10 µg/ml), rIL-6 (c<sub>final</sub> 30 ng/ml). An Tag 2 werden die Zellen 1:3 gesplittet und neues Medium mit rIL-23 (c<sub>final</sub> 10 ng/ml) und αINFγ (c<sub>final</sub> 10 µg/ml) zugeben. Am dritten Tag wird ein Drittel des Mediums durch frisches ersetzt, mit αINFγ und rIL-23 (je c<sub>fresh</sub> 10ng/ml), ersetzt.

Zur Überprüfung des Differenzierungserfolgs wird ein Teil der Zellen wie unter 4.2.6.1 beschrieben stimuliert, und eine Zytokinfärbung wie unter 4.2.6.2 durchgeführt. Die Zellen werden im Anschluss am Guava Durchflusszytometer gemessen und mit der Software InCyte ausgewertet.

Die restlichen Zellen werden gesammelt, und jedes Well mit PBS gewaschen, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in je 1 ml TRIzol Reagent resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert und bei -80° C eingefroren.

#### 4.2.7.2 Auswertung mittels TAC-Software

Diese Software wird von ThermoFisher Scientific zur Verfügung gestellt. Als Vergleichsdatenbank wird die „Library Clariom D Mouse“ verwendet. Alle Proben sind vor der Datenauswertung auf ihre Qualität geprüft worden.

#### 4.2.8 Gewinnung von Liquor aus Patienten mit Multiplen Sklerose

Die Patientenproben werden durch Fachpersonal der „Allgemeinen neuroimmunologischen Ambulanz“ am LMU Klinikum in Großhadern gewonnen. Als Vergleichsmaterial wird den Patienten zusätzlich Blut abgenommen, und die Zelltypen durch Dichtezentrifugation getrennt und in FBS und 10 % DMSO eingefroren. Für diese Arbeit werden Zellen von zwei Patienten verwendet, Patient 1 und 2.

Das humane Material wurde unter Einhaltung der Datenschutzbestimmungen und mit Zustimmung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München gewonnen. Alle Teilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis gemäß den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki.

##### *4.2.8.1 Zellisolation aus Cerebrospinalflüssigkeit*

Die Liquorflüssigkeit wird mittels Lumbalpunktion entnommen und in ein Tube überführt und auf Eis gestellt. Zur Gewinnung der Zellen wird die Flüssigkeit bei 300 g, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird in 1 ml Aliquots abgenommen und bei -20 ° eingefroren. Das Zellpellet wird in 700 µl Externe Lösung resuspendiert und je 200 µl auf PDL-beschichtete Deckgläschen ausgesät (siehe 4.2.9.1). Den Zellen wird für mindestens 30 min Zeit gegeben um sich zusetzen. Bis zur weiteren Verwendung werden die Zellen auf Eis gestellt.

##### *4.2.8.2 PBMC-(Peripher mononukleare Blutzellen) Isolation aus Blut*

Die Zellen wurden zunächst aufgetaut, in vorgewärmtes RPMI Medium mit 10 % FBS überführt und bei 350 g, 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit kaltem Medium gewaschen und die Zellen dann in MACS Puffer aufgenommen um CD4<sup>+</sup> Zellen zu isolieren. Dazu wurde das EasySep™ Human CD4<sup>+</sup> T-Cell Isolation Kit von Stemcell verwendet und nach Hersteller Angaben verfahren. Die Zellen wurden dann in Medium aufgenommen und je 1x10<sup>5</sup> Zellen auf PDL-beschichteten Deckgläser ausgesät.

#### 4.2.9 Elektrophysiologie-Patch Clamp

Um die Expression von TRPM7 auf der Zellmembran nachzuweisen, wird mittels selektiver Lösungen eine Umgebung geschaffen, die uns für TRPM7 charakteristische Ströme liefert,

wenn dieser in der Zelloberfläche vorhanden ist. Somit lassen sich der Kanal unabhängig von der Kinase auf Funktion überprüfen.

Alle Zellen werden im sogenannten „Whole-Cell“ Patch -Clamp Modus gemessen. Die Aufzeichnung erfolgt mithilfe des EPC10 Verstärkers, der durch die PatchMaster Software gesteuert wird. Zum patchen der Zellen, verwendet man Borosilikatglaspipetten, die mit einem Pipettenzieher auf die gewünschte Größe der Öffnung gezogen werden. Optimale Ergebnisse werden mit einem Widerstand von 2-3 M $\Omega$  erzielt. Diese Pipette wird mit einer internen Lösung gefüllt, und über die Messelektrode geschoben und befestigt.

Zur Messung werden die mit Zellen behafteten Deckgläser in eine Kulturschale überführt und vorsichtig mit externer Lösung bedeckt. Die Schale wird in der Halterung fixiert und Referenzelektrode und Messelektrode in die Lösung eingetaucht. Eine relativ festsitzende gesunde Zelle wird ausgesucht und vorsichtig in einem 45°-Winkel angepatcht. Durch Unterdruck wird eine sogenannter Gigaseal erstellt, der entsteht, wenn eine starke Verbindung zwischen Pipette und Membran hergestellt wird, und so ein elektrischer Widerstand entsteht. Wird weiter Druck ausgeübt, öffnet sich die Membran und es wird eine dichte Verbindung zwischen Pipetteninnerem und Zellinnerem erreicht.

Durch die Unterschiede in der ionischen Zusammensetzungen der beiden Lösungen, externe und interne, wird die Spannung um 10 mV korrigiert. Zur Messung der TRPM7-Ströme wird eine Spannungsrampe im Bereich von -100 bis +100mV über einen Zeitraum von 50 ms angelegt. Durch das Haltepotential von 0 mV sind die meisten spannungsabhängigen Kanäle inaktiv. Die Kapazitiven Ströme sowie der Serienwiderstand werden über die automatischen Kapazitätskompensation der Software für jede Messung ermittelt.

Die generierten Daten werden über die Fitmaster Software exportiert und mittels der Igor Pro 6 Software ausgewertet. Zur Darstellung von TRPM7-Strömen, werden deren Ein- und Auswärtsstromamplituden bei -80 und +80 mV extrahiert. Diese Daten werden auf die einzelnen Kapazitäten normiert, man erhält so die Stromdichte (pA/pF), und diese gegen die Zeit (s) aufgetragen.

Dazu wird eine repräsentative Strom-Spannungs-Beziehungen mit einem Anfangsstrom bei 2s und ein entwickelter TRPM7-Strom am Endpunkt bei 300s dargestellt.

#### *4.2.9.1 Beschichtung der Glasdeckgläser*

Um eine bessere Haftung der Zellen, insbesondere bei Suspensionszellen, zu gewährleisten werden diese auf PDL-beschichtete Deckgläser ausgesät. Das synthetische PDL ist ein positiv geladenes Homopolymer, das mit der negativen Membran der Zellen eine ionische Bindung eingeht [164].

Die verwendeten Deckgläser haben einen Durchmesser von 12 mm. Zur Reinigung werden die Deckgläser zuerst in einer Petrischale gegeben, mit 70 % Ethanol überschichtet und vorsichtig geschwenkt. Der Alkohol wird abgeschüttet und die Deckgläser mit doppelt destilliertem Wasser gespült. Die Gläschen werden nun in eine aufrechte Position gebracht, getrocknet und in ein steriles, verschließbares Aufbewahrungsgefäß überführt. Die sauberen Deckgläser werden nun unter den gängigen Standardbedingungen autoklaviert.

Alle weiteren Arbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die sauberen Deckgläschen werden nun mit einer 0,1 % PDL-Lösung überschichtet und für 20 min bei RT inkubiert. Die Deckgläschen werden gewendet und das Procedere wiederholt. Die PDL-Lösung wird abgegossen und die beschichteten Deckgläser zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet.

#### *4.2.9.2 Messung von Jurkat Zellen, inkubiert in Pertussis Toxin*

Um einen potentiell blockierenden Einfluss des Pertussis Toxins auf die Funktion des TRPM7 Kanals in T-Zellen zu prüfen, wurden Jurkat Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Pertussis Toxin inkubiert und anschließend gepatcht.

Die Zellen werden mit drei verschiedenen Konzentrationen des Toxins im Medium (50 ng/ml, 100 ng/ml und 200 ng/ml) inkubiert. Als Kontrolle werden zeitgleich Zellen unter gleichen Bedingungen ohne Toxin inkubiert. Zur Aussaat wird die entsprechende Menge an PDL-beschichteter Deckgläser in 12 Well Platten gegeben. Je Deckglas werden  $5 \times 10^4$  Zellen in 1 ml Mediums mit entsprechender Konzentration an Toxin gegeben und für 4 h bei 37° C inkubiert. Die Deckgläser werden nach Beendigung der Inkubation mit RPMI + 10% FBS gewaschen und bis zur Messung bei 37 °C gehalten.



#### 4.2.10 Datenauswertung und statistische Analyse

Die Auswertung der Daten und die Statistische Analyse erfolgten durch die Programme Igor Pro, FitMaster, GraphPad, FlowJo und TAC-Software.

Alle Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurden entweder der ungepaarte T-Test oder ein zweiseitiger ANOVA verwendet. Der Angewandte p-Wert liegt bei  $< 0,05$ .

### 5. Ergebnisse

Aktuellste Erkenntnisse zeigen die regulatorische Eigenschaft der TRPM7-Kinase bei der Immunhomöostase, speziell bei der Differenzierung von  $T_H17$  und  $T_{reg}$  Populationen [23]. Um diesen Effekt und die Rolle der TRPM7-Kinase auf die MS zu beurteilen, wurden im Zuge dieser Arbeit zwei Mausmodelle der MS, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), in *Trpm7* Kinase-defizienten Mäusen sowie deren Wildtyp etabliert. Diese Versuche ermöglichen die unabhängige Untersuchung von TRPM7-Kanal und Kinase und deren Einfluss auf die Entstehung und das Fortschreiten der EAE. Um die Möglichkeit zu schaffen gewonnene Erkenntnisse aus den Tierversuchen später auf den Menschen zu übertragen, wurden Lymphozyten akuter MS-Patienten auf die Expression von TRPM7 überprüft.

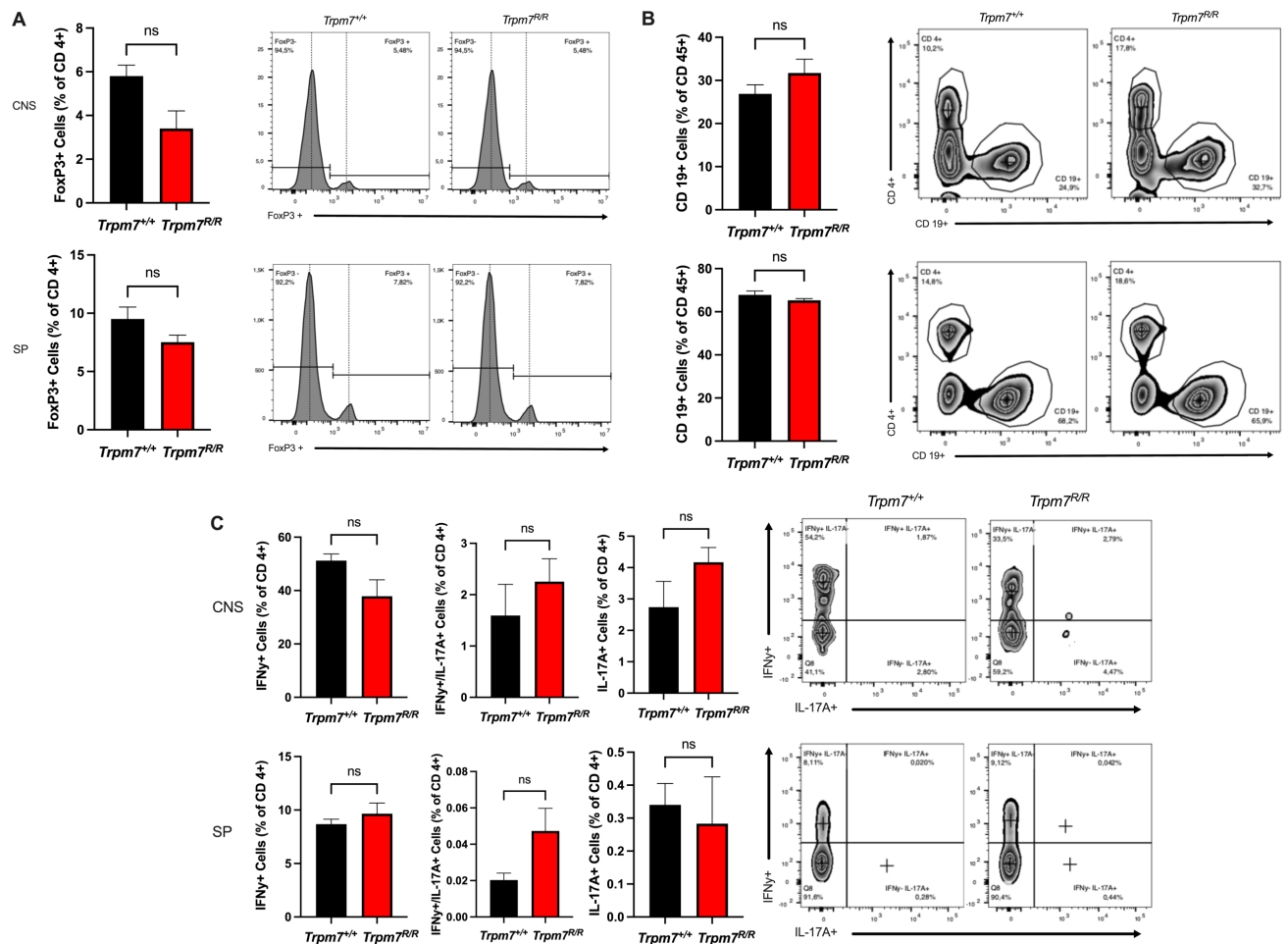
#### 5.1 Die TRPM7-Kinasefunktion in der aktiven experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis der Maus

Als Initialversuch haben wir die am einfachsten zu induzierende Methode gewählt, die aktive EAE. Der Erfolg und die Durchführbarkeit dieser Versuche ist von vielen Faktoren, wie zum Beispiel der Tierhaltung, dem Stress der Tiere oder den Tieren selbst, abhängig [165]. Daher haben wir uns entschieden, zum Beginn der Versuche die am weitesten verbreitete Methode anzuwenden, um einen ersten Eindruck zu gewinnen, ob und wie die EAE in den hier verwendenden Mäusen funktioniert. Jede Versuchsgruppe umfasste 10-12 Tiere, wobei je zur Hälfte *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tiere verwendet wurden. Soweit möglich wurde auf eine

gleichmäßige Verteilung bei Alter und Geschlecht über beide Genotypen geachtet. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

### 5.1.1 Vergleich von Leukozyten Populationen in unstimulierten *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäusen *ex vivo*

Um einen generellen Eindruck über die basale Beschaffenheit des zentralen Nervensystems der Genotypen *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* auf zellulärer Ebene zu gewinnen und auszuschließen, dass bereits ohne Immunisierung der Tiere ein Unterschied besteht, wurden je drei Tiere analysiert. Es konnte für keine der untersuchten Zellpopulationen ein Unterschied festgestellt werden (Abb. 5). Die Ausgangssituation für alle Versuche innerhalb der Kohorten *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* im ZNS sowie der Milz ist als ähnlich anzusehen. Im allgemeinen haben wir uns die wichtigsten Zellpopulationen für unsere Versuche angesehen. Darunter sind T-Effektor Zellen  $T_{reg}$ ,  $T_H17$  sowie  $T_H1$  und B-Zellen.



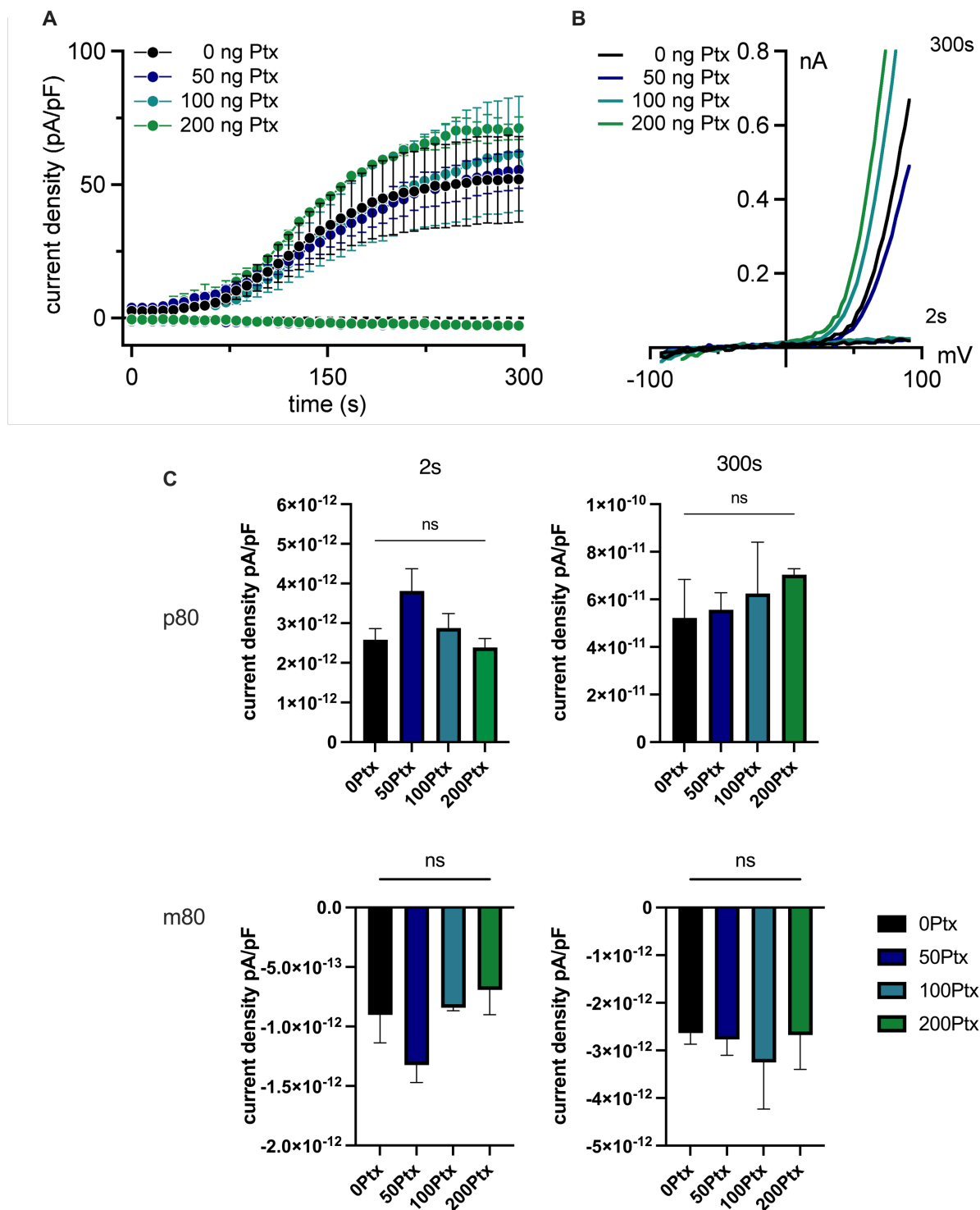
**Abbildung 5: Basaler Status der zellulären Beschaffenheit des ZNS und der Milz von *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäusen.** Messung der prozentualen Anteile der Lymphozyten-Populationen mittels Durchflusszytometrie von nicht immunisierten *Trpm7<sup>+/+</sup>* (n=3) und *Trpm7<sup>R/R</sup>* (n=3) Mäusen. Die Ergebnisse wurden zur Kontrolle, neben den Zellen des ZNS auch bei Zellen der Milz erhoben. Zu jedem Balkendiagramm (Mittelwert  $\pm$  SEM) wurde exemplarisch ein repräsentativer FACS Blot abgebildet. Die oberen Blots und Diagramme stellen jeweils die Ergebnisse aus dem ZNS dar, die unteren entsprechen den Ergebnissen aus der Milz. (A) Prozentualer Anteil an T<sub>reg</sub> Zellen aller CD4<sup>+</sup> Zellen (B) Prozentualer Anteil der CD19<sup>+</sup> Zellen aller CD45<sup>+</sup> Zellen. (C) Prozentualer Anteil der IL-17A<sup>+</sup>, INF $\gamma$ <sup>+</sup> sowie doppelt positiver T-Zellen aller CD4<sup>+</sup> Zellen. ns P > 0,05, \* P  $\leq$  0,05, \*\* P  $\leq$  0,01.

### 5.1.2 Überprüfung des Einflusses des Pertussis Toxins auf die TRPM7-Kanalfunktion

Das Pertussis Toxin ist ein Katalysator der ADP-Ribosylierung einiger G-Proteine und verhindert so die Wechselwirkung zwischen G-Protein-Heterotrimeren mit deren Rezeptoren. Die Aktivierung wird so blockiert, die  $\alpha$ -Untereinheiten des G-Proteins verbleiben im inaktiven Zustand und können nicht die Adenylcyclase inaktivieren oder K<sup>+</sup> Kanäle öffnen [166]. Einiges deutet außerdem darauf hin, dass das Pertussis Toxin über den Einfluss auf G-Proteine den Ca<sup>2+</sup> Einstrom in Zellen modulieren kann [167]. Mittels Patch-Clamp Versuchen überprüfen wir eine potentiell modulierende Wirkung von PTx auf die Kanalfunktion von TRPM7 überprüft.

Keine der verwendeten Konzentrationen legte eine modulatorische Wirkung des Pertussis Toxins auf die TRPM7-Kanalfunktion nahe. Für jede getestete Konzentration an PTx zeigten die Zellen die für TRPM7 typische Stromentwicklung (Abb. 6 A-C).

Bei der Inkubation mit 200 ng/ml war zwar eine leichte Steigerung der Stromdichte zu erkennen, diese war aber nicht signifikant. In Summe kann festgehalten werden, dass das PTx keinen direkten Einfluss auf den TRPM7-Kanal hat und somit weiterhin einer unabhängigen Beobachtung von Kanal und Kinase auf Hinblick der EAE möglich ist.



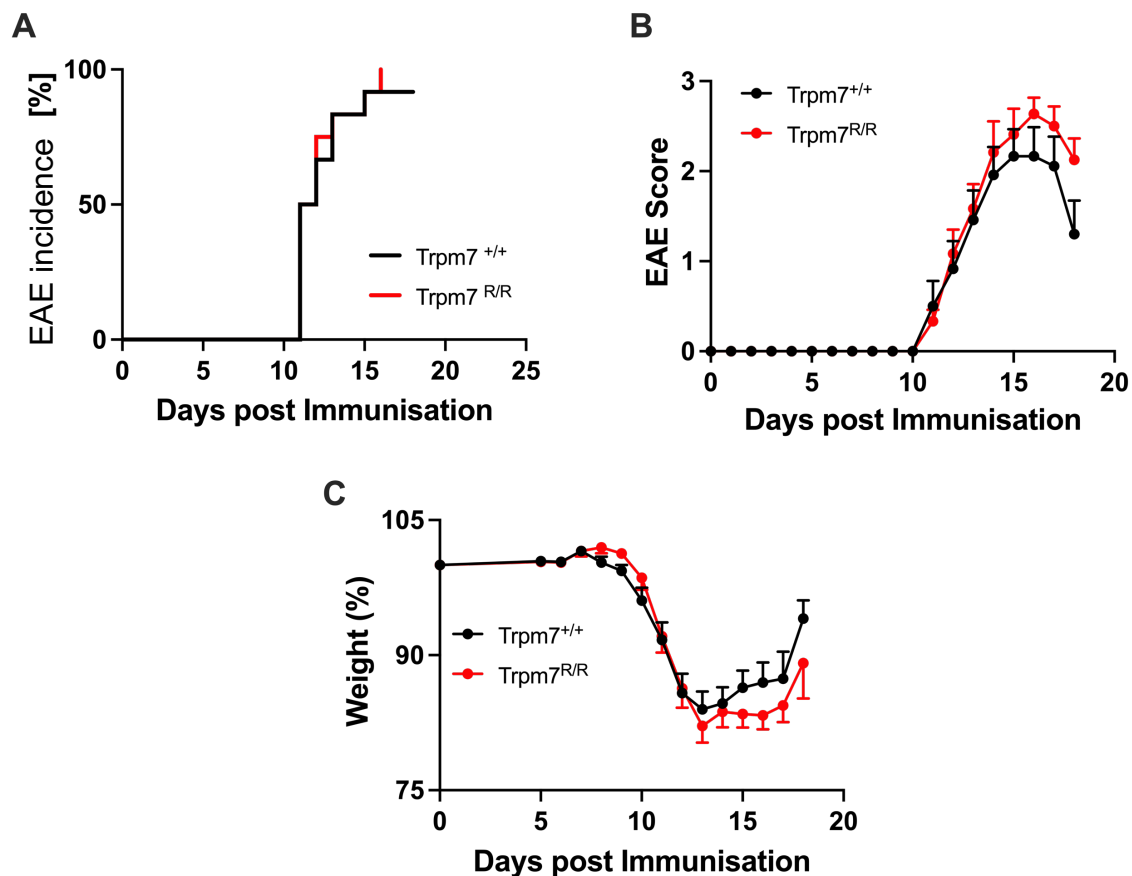
**Abbildung 6: Überprüfung des Einflusses des Pertussis Toxin auf die TRPM7-Kanalfunktion.** (A-B) Elektrophysiologische Messung der Stromdichte (pA/pF) mittels der „Whole-Cell Patch Clamp“ Methode, sowie die repräsentative Darstellung der Strom/Spannung Beziehung (I-V) bei 2s und 300 s. Die TRPM7-Ströme wurden über eine Spannungsrampe von -100 bis +100 mV innerhalb von 50 ms ausgelöst, dabei wird ein Haltepotential von 0 mV angelegt und zur Maximierung der Ströme eine  $Mg^{2+}$  freie externe Lösung mit 3 mM  $Ca^{2+}$  verwendet. Gemessen wurden Jurkat Zellen, inkubiert für 4 h in verschiedenen Konzentrationen PTx. Schwarz = 0 ng/ml mit n=3, als Kontrolle; blau = 50 ng/ml mit n = 7; türkis = 100 ng/ml mit n = 3; grün = 200 ng/ml mit n = 2. (E) Balkendiagramme der Auswärtsströme bei 0s und 300s (Mittelwert  $\pm$  SEM). ns, nicht signifikant  $P>0,05$

### 5.1.3 Vergleich zwischen *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäusen bei der aktiven EAE *in vivo*

Die Durchführbarkeit der aktiven EAE in unserer Tierhaltung und der verwendeten Mauslinie konnte bestätigt werden. Nahezu alle Tiere beider Genotypen sind erkrankt. Der Verlauf der Erkrankung verlief ohne Abweichungen von der Norm, womit die Etablierung der Versuchsart in der neuen Tierhaltung sowie einer neuen Mauslinie als geglückt angesehen werden.

Da der erste Punkt der Etablierung der aktiven EAE bestätigt ist, beschäftigten wir uns weiter mit den oberflächlichen Unterscheidungskriterien zwischen den beiden Genotypen.

Beide Genotypen zeigten eine gleichermaßen hohe Inzidenz, siehe Abb. 7 A. Es sind nahezu alle Tiere beider Gruppen erkrankt, was somit im Rahmen der üblichen Inzidenz liegt.

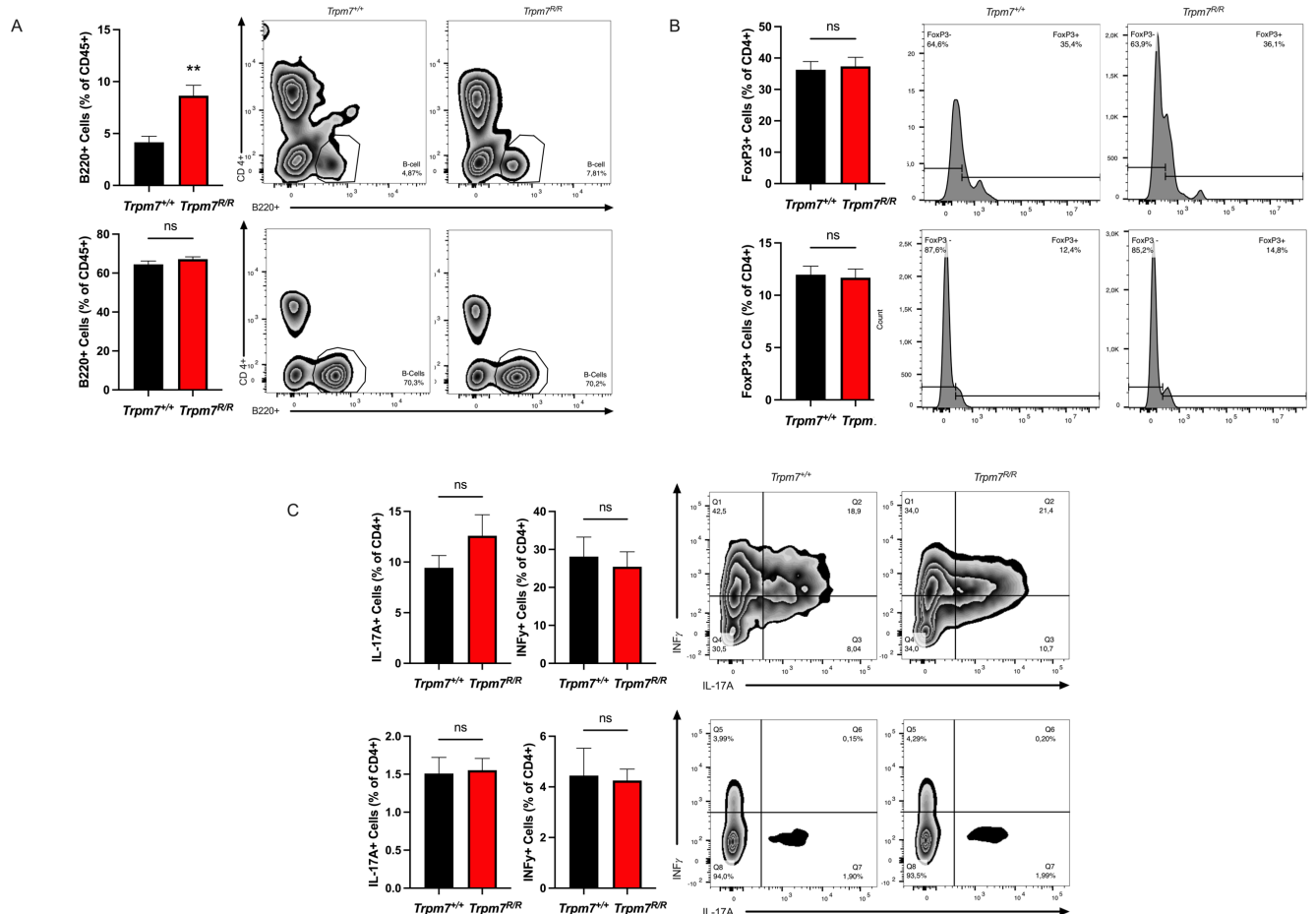


**Abbildung 7: Aktive EAE in *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäusen.** Die EAE wurde bei den Mäusen durch die Immunisierung mit MOG/CFA und der Injektion von PTx ausgelöst. (A) Inzidenz der Tiere in Prozent nach Immunisierung. (B) Auftreten von Klinischen Scores (0-3), nach Vorgabe des entsprechenden TVA, über den gesamten Versuchszeitraum aller Tiere. (C) Gewichtsreduktion der Versuchstiere in Prozent bezogen auf den Initialwert. Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM jeder Gruppe.

Der erste Hinweis, noch vor dem Auftreten erster motorischer Symptome, ist die Gewichtsreduktion der Tiere (Abb. 7C). Die Tiere wurden am Tag der Induktion der EAE gewogen, um das Initialgewicht zu erhalten. Über den gesamten Versuchsverlauf wurde das Gewicht dokumentiert. Abgebildet wurde die Gewichtsveränderung der Tiere in Prozent im Vergleich zum Ausgangsgewicht über die Dauer des Versuchs. Die Auswertung zeigt keinen nennenswerten Unterschied zwischen *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>*. Beide Kohorten nahmen gleichermaßen an Gewicht ab und zeigten gegen Ende des Versuches wieder eine leichte Zunahme. Nach wenigen Tagen begannen die ersten Tiere an Gewicht zu verlieren und verloren in den folgenden Tagen schneller weiter an Gewicht. Diese rasante Abnahme stagnierte nach ca. 12 Tagen. Auch der Score der Tiere wurde im Verlauf des Versuchs überwacht und dokumentiert. Auch hier ist eine typische Entwicklung der aktiven EAE zu beobachten. Nach der Entwicklung der ersten milden Symptome, und somit der Vergabe geringer Scores, nehmen diese in den ersten Tagen schnell zu und steigen bis auf den Höchstwert von 3 an. Hier ist von einer negativen Korrelation zwischen Gewichtsreduktion und Anstieg des Scores auszugehen. Nach Erreichen der Höchst-Scores reduzieren sich die Symptome nach einer Zeit bei einigen Tieren wieder, der Score reduziert sich wieder (Abb. 7 B).

#### 5.1.4 Vergleich zwischen *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäusen bei der aktiven EAE *ex vivo*

Nach erfolgreicher Etablierung des aktiven EAE-Versuchs, wurden alle Tiere auch auf zellulärer Ebene analysiert. Hierzu wurden je Tier das ZNS sowie die Milz als Kontrolle gemessen. Wir haben uns auf Zellpopulationen konzentriert, die typischerweise an der Entwicklung der EAE beteiligt sind und gleichzeitig durch die Aktivität von TRPM7 beeinflusst werden könnten. B-Lymphozyten im allgemeinen,  $T_H17$  -,  $T_H1$  - sowie  $T_{reg}$  Zellen betrachtet man den Einfluss der TRPM7-Kinase auf die Differenzierung von  $T_H17$  und  $T_{reg}$  Zellen, war unsere Erwartung bei diesen Zellpopulationen Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zu sehen.



**Abbildung 8: Vermehrt B-Zellen im ZNS der *Trpm7<sup>R/R</sup>* im Vergleich zu *Trpm7<sup>+/+</sup>* Mäusen, während aktiver EAE.** Messung der prozentualen Anteile der Lymphozytenpopulationen mittels Durchflusszytometrie von *Trpm7<sup>+/+</sup>* (n=11) und *Trpm7<sup>R/R</sup>* (n=12) Mäuse nach Entwicklung einer EAE. Die Ergebnisse wurden zur Kontrolle neben Zellen des ZNS auch an Zellen der Milz erhoben. Zu jedem Balkendiagramm (Mittelwert  $\pm$  SEM) wurde exemplarisch ein repräsentativer FACS Blot abgebildet. Die oberen Blots und Diagramme stellen jeweils die Ergebnisse aus dem ZNS dar, die unteren die entsprechenden Ergebnisse aus der Milz. (A) Prozentualer Anteil an B220<sup>+</sup> Zellen aller CD45<sup>+</sup> Zellen (B) Prozentualer Anteil der FoxP3<sup>+</sup> Zellen aller CD4<sup>+</sup> Zellen. (C) Prozentualer Anteil der INF $\gamma$ <sup>+</sup> sowie IL-17A<sup>+</sup> Zellen alle CD4<sup>+</sup> Zellen. ns P > 0,05, \* P  $\leq$  0,05, \*\* P  $\leq$  0,01.

Die Analyse erfolgte über Durchflusszytometrie und der Anfärbung der charakteristischen Marker der einzelnen Zellpopulationen.

Es zeigte sich, dass im Vergleich zwischen *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* weder im ZNS noch in der Milz ein Unterschied im prozentualen Anteil der T-Lymphozyten - T<sub>reg</sub>, T<sub>H</sub>17 sowie T<sub>H</sub>1 Populationen - besteht (Abb. 8 B-C). Diese Ergebnisse decken sich mit denen unter Punkt 5.1.2. Im ZNS sind vorwiegend INF $\gamma$  positive Zellen als Effektorzellen zu finden, sowohl in *Trpm7<sup>+/+</sup>* als auch in *Trpm7<sup>R/R</sup>*, welche für eine T<sub>H</sub>1 Population stehen. Das Verhältnis für T<sub>reg</sub> zu T<sub>H</sub>17

Zellen im ZNS ist für beide Genotypen, *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>*, gleich groß. In der Milz ist die Population der T<sub>reg</sub> Zellen im Vergleich zu denen der T<sub>H</sub>17 Zellen zwar größer, im Vergleich von *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* aber nicht unterschiedlich. In den Proben aus dem ZNS der *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäuse wurden hingegen signifikant mehr B-Zellen als in denen der *Trpm7<sup>+/+</sup>* Mäuse festgestellt. Im Vergleich der Kontrollen aus der Milz aber, sind die Populationsgrößen nicht zu unterscheiden (Abb. 8A). In diesem Versuch konnte jedoch nicht festgestellt werden, ob dieser Effekt B- oder T-Zell abhängig ist, da auch die B-Zellen der *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäuse, Kinase-defizient sind. Auch ob sich dieser Effekt positiv oder negativ auf die Prognose und Verlauf der Krankheit auswirkt, kann nicht festgestellt werden. Diese ersten Versuche mittels aktiver EAE sollten zunächst zur Etablierung dienen und konnten bereits innerhalb der ersten Pilotversuche interessante Ergebnisse liefern. Diese Ergebnisse und die Limitationen der aktiven EAE werden im weiteren Verlauf der Arbeit weiter spezifiziert.

## 5.2 Die TRPM7-Kinasefunktion in der passiven experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis der Maus

Nachdem klar war, dass die Induktion einer EAE in Tierhaltung und Mauslinien praktikabel ist und erste Unterschiede *in vivo* festgestellt wurden, führten wir eine weitere EAE-Methode durch, um die Ergebnisse weiter zu spezifizieren. Die aktive EAE ist die älteste und am häufigsten angewendete Methode zur Induktion einer EAE. Durch die Immunisierung mittels Adjuvans und Pertussis Toxin ist die so geschaffene Entzündungsreaktion sehr stark und weicht doch von der tatsächlichen Krankheitspathogenese der multiplen Sklerose ab. Dazu kommt, dass das Pertussis Toxin, das in der aktiven EAE zur Anwendung kommt, eventuelle Effekte der TRPM7-Kinase auf anderem Wege kompensiert. So ist bereits beschrieben worden, dass das Pertussis Toxin, die Zahl der FOXP3<sup>+</sup> Zellen innerhalb der Milz reduzieren kann [168]. Da wir also sehen wollen, ob der positive Effekt der TRPM7-Kinasedefizienz auf die Anzahl der T<sub>reg</sub> Zellen auch im ZNS bei der EAE zum Tragen kommt, muss eine andere Induktionsmethode verwendet werden. Bei der T<sub>H</sub>17 Differenzierung spielen einige Zytokine und Faktoren eine Rolle. Nach der T-Zelle Aktivierung über den TCR ist die Differenzierung von T<sub>H</sub>17 und T<sub>reg</sub> Zellen hauptsächlich über den TGF- $\beta$  Signalweg reguliert. Dabei ist, neben weiteren Ko-Stimulantien, dessen Konzentration entscheidend, hohe Konzentrationen führen in der Regel zu T<sub>reg</sub> Zellen, niedrige hingegen zur T<sub>H</sub>17 Differenzierung. Die Expression von IL-1 $\beta$  fördert dabei die Expansion der T<sub>H</sub>17 Zellen [169]. Pertussis Toxin fördert nachweislich die



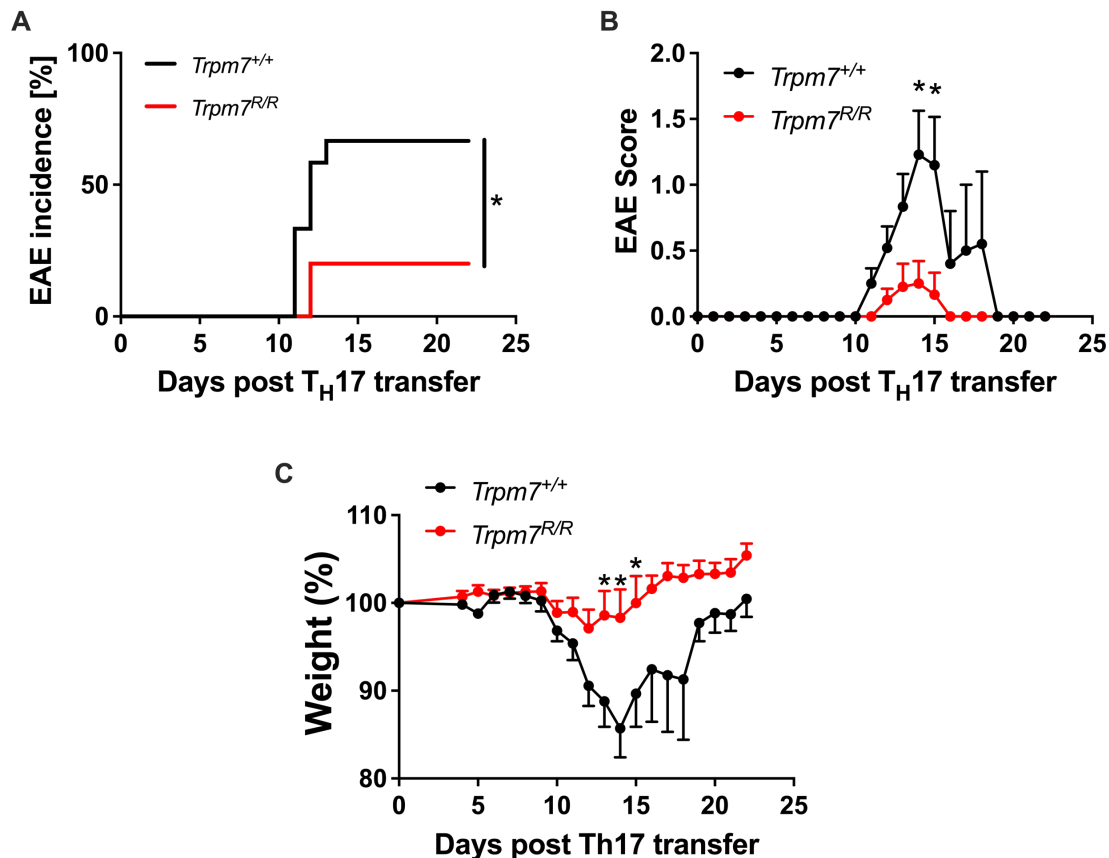
Expression von IL-1 $\beta$ , was die Schlussfolgerung zulässt, dass eventuelle Effekte durch die TRPM7-Kinase, die sich auf die Differenzierung und Expansion T<sub>reg</sub> und T<sub>H</sub>17 Populationen beziehen, unter Verwendung von Pertussis Toxin nicht nachzuweisen sind [170]. Da die TRPM7-Kinase ein Modulator innerhalb des TGF- $\beta$  Signalwegs ist und die T<sub>H</sub>17 Expression mindert, sie jedoch nicht gänzlich stoppt, kann eine vermehrte Expression von IL-1 $\beta$  diesen Effekt kompensieren.

Daher haben wir als nächstes eine passive EAE mit adoptiven Transfer bereits MOG-spezifischer T-Zellen, die im Vorfeld *in vitro* in T<sub>H</sub>17 Zellen differenziert wurden, durchgeführt. Auch hier wurden zwei Versuche durchgeführt. Jede Versuchsgruppe umfasste 10-12 Tiere, wobei je zur Hälfte *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tiere verwendet wurden. Soweit möglich, wurde auf eine gleichmäßige Verteilung bei Alter und Geschlecht über beide Genotypen geachtet.

#### 5.2.1 Vergleich zwischen *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäusen bei der passiven EAE *in vivo*

Da die Immunisierung weniger aggressiv im Vergleich zur aktiven EAE ist, war generell eine geringere Inzidenz zu erwarten. Die Kontrolle der Tiere und die Dokumentation aller von außen wahrnehmbaren Merkmalen erfolgte, wie schon bei der aktiven EAE, über den gesamten Versuchszeitraum. Auch hier wurden das Initialgewicht notiert um die Gewichtsentwicklung der Tiere beobachten zu können.

Tatsächlich konnten wir bei der passiven EAE bereits eindeutige klinische Unterschiede zwischen den *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäusen beobachten. Signifikant weniger Tiere der *Trpm7<sup>R/R</sup>* Gruppe entwickelten Symptome und sind erkrankt, im Vergleich zur *Trpm7<sup>+/+</sup>* Gruppe (Abb. 9 A). Aber auch bei den erkrankten Tieren war ein deutlich milderer Verlauf der EAE bei *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tieren zu beobachten, im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen. Die *Trpm7<sup>R/R</sup>* mit klinischen Symptomen erreichten einen signifikant geringen Score im Vergleich der kranken Tiere der *Trpm7<sup>+/+</sup>* (Abb.9 B). Darüber hinaus verloren die Tiere in der *Trpm7<sup>R/R</sup>* signifikant weniger an Gewicht im Vergleich zu den *Trpm7<sup>+/+</sup>* Tieren und nahmen gegen Ende des Versuchs im Vergleich zum Ausgangsgewicht noch weiter an Gewicht zu (Abb. 9 C).



**Abbildung 9: Milderer Verlauf der passiven EAE in  $Trpm7^{R/R}$  Mäusen, verglichen mit  $Trpm7^{+/+}$  Mäusen.** Die EAE wurde bei den Mäusen durch die Immunisierung mit *in vitro* in  $T_H17$  Zellen differenzierten MOG-spezifischen Zellen ausgelöst. (A) Inzidenz der erkrankten Tiere in Prozent nach Immunisierung. (B) Auftreten von klinischen Scores (0-3), nach Vorgabe des entsprechenden TVA über den gesamten Versuchszeitraum aller Tiere. (C) Gewichtsreduktion der Versuchstiere in Prozent bezogen auf den Initialwert. Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM jeder Gruppe. ns  $P > 0,05$ , \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ .

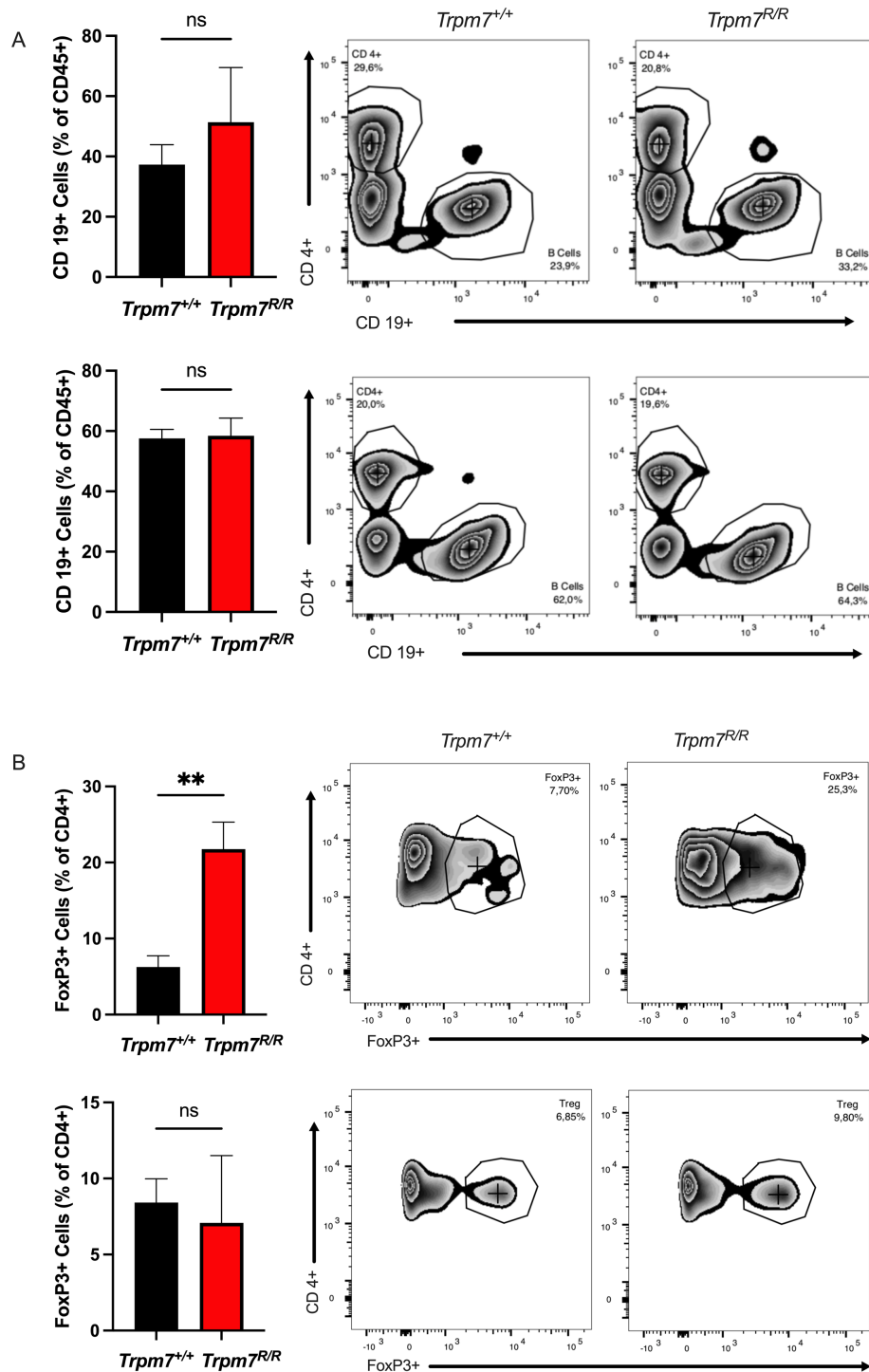
### 5.2.2 Vergleich zwischen erkrankten $Trpm7^{+/+}$ und $Trpm7^{R/R}$ Mäusen bei der passiven EAE *ex vivo*

Nachdem bereits klinisch ein signifikanter Unterschied zu sehen war, galt es den zellulären Mechanismus dahinter zu untersuchen. Hierfür wurden ebenfalls das ZNS und die Milz der erkrankten Tiere analysiert. In der aktiven EAE konnten wir sehen, dass signifikant mehr B-Zellen in das ZNS der Kinase-defizienten Mäuse migrieren (Abb. 10 B). Dieser Effekt kann sowohl B-Zell sowie T-Zell abhängig sein.

In der passiven EAE konnte für die B-Zellen keine vermehrte Migration in das ZNS der erkrankten  $Trpm7^{R/R}$  Mäuse (n=2) im Vergleich zu den erkrankten  $Trpm7^{+/+}$  (n=8) festgestellt

werden. Auch wenn tendenziell eine höhere Zahl migrierte, war der Effekt nicht signifikant (Abb. 10 A).

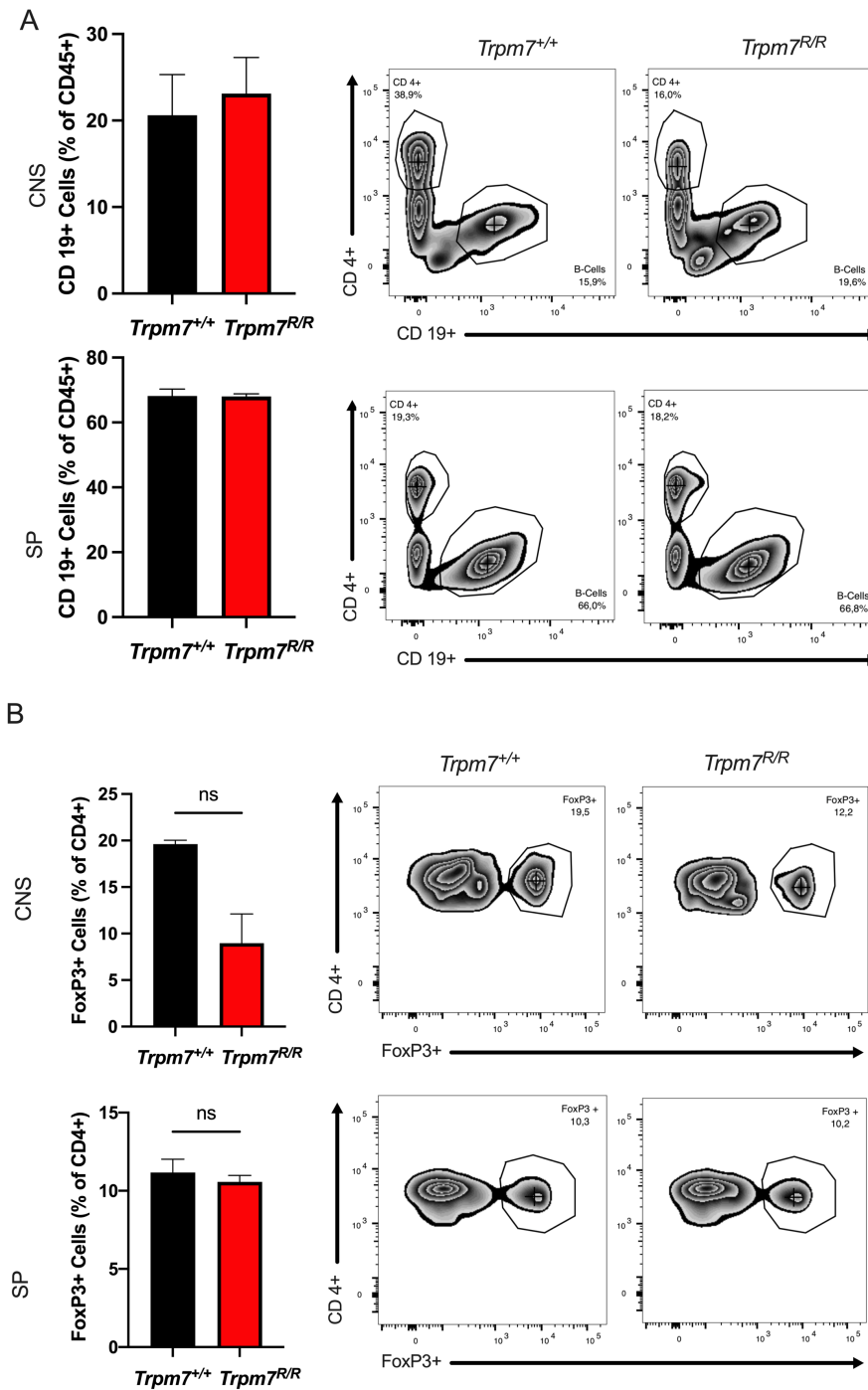
Die Zahl der FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen im ZNS der kranken *Trpm7<sup>R/R</sup>* allerdings, ist im Vergleich zu den kranken *Trpm7<sup>+/+</sup>* Tieren signifikant höher (Abb. 10B). In der Kontrolle aber waren die prozentualen Anteile beider Gruppen gleich.



**Abbildung 10: Erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen im ZNS der symptomatischen *Trpm7<sup>R/R</sup>* bei der passiven EAE.** Messung der prozentualen Anteile der Lymphozyten-Populationen mittels Durchflusszytometrie von *Trpm7<sup>+/+</sup>* (n=8) und *Trpm7<sup>R/R</sup>* (n=2) Mäuse nach Entwicklung einer EAE. Die Ergebnisse wurden zur Kontrolle neben den Zellen des ZNS auch bei Zellen der Milz erhoben. Zu jedem Balkendiagramm (Mittelwert  $\pm$  SEM) wurde exemplarisch ein repräsentativer FACS Blot abgebildet. Die oberen Blots und Diagramme stellen jeweils die Ergebnisse aus dem ZNS dar, die unteren entsprechen den Ergebnissen aus der Milz. (A) Prozentualer Anteil an CD19<sup>+</sup> Zellen aller CD45<sup>+</sup> Zellen (B) Prozentualer Anteil der FoxP3<sup>+</sup> Zellen aller CD4<sup>+</sup> Zellen. ns P > 0,05, \* P  $\leq$  0,05, \*\* P  $\leq$  0,01.

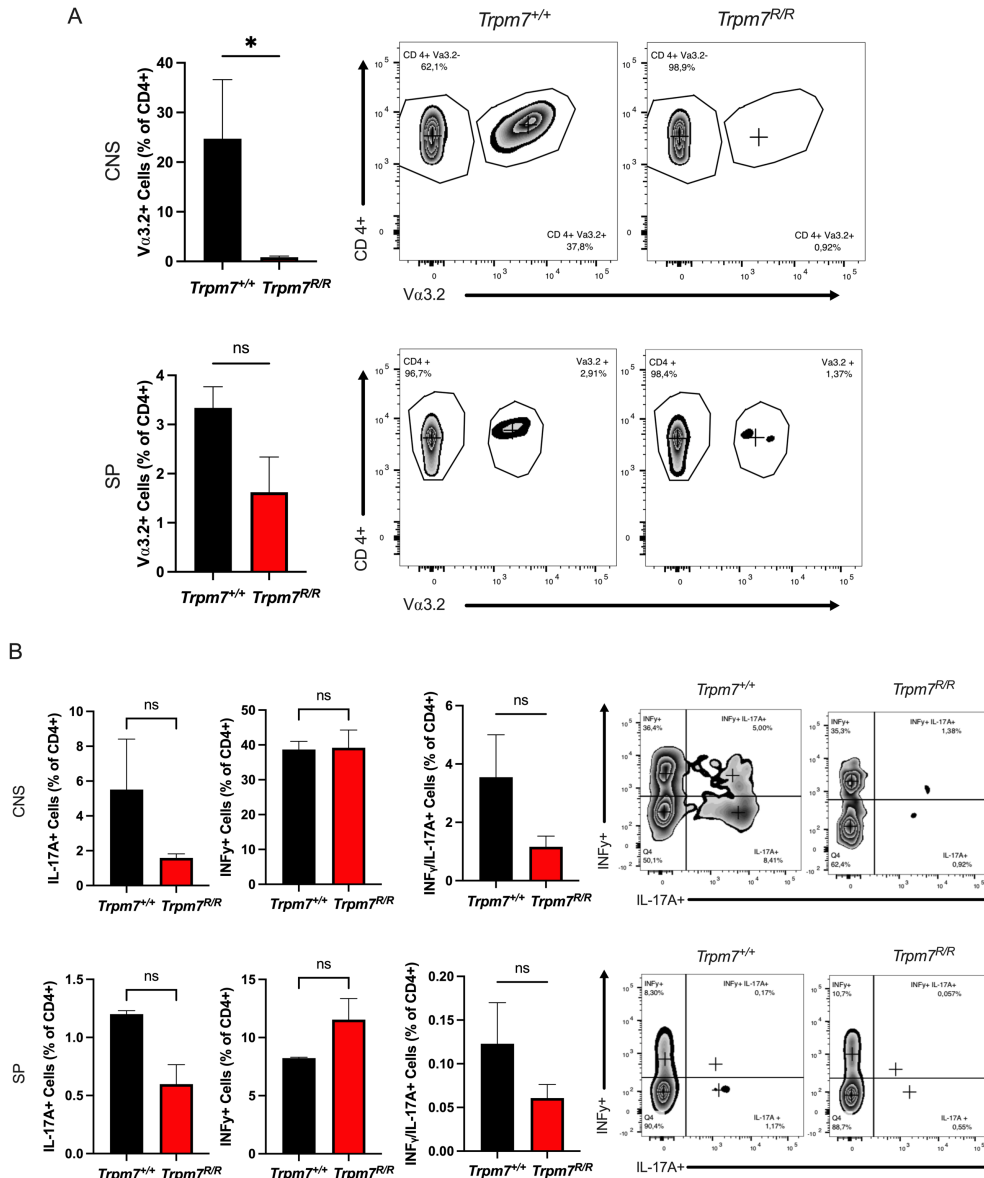
### 5.2.3 Vergleich zwischen nicht erkrankten *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäusen bei der passiven EAE *ex vivo*

Da in dem ersten Versuch der passiven EAE deutlich weniger Tiere der *Trpm7<sup>R/R</sup>* Gruppe erkrankten, überprüften wir im nächsten Versuch auch die nicht erkrankten Tiere. Die Analyse der Zellen in gesunden, aber immunisierten Tieren, kann Rückschlüsse auf mögliche Mechanismen geben, an welchen die TRPM7-Kinase beteiligt ist.



**Abbildung 11: Keine Unterschiede von FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen im ZNS, zwischen der nicht symptomatischen *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* bei der passiven EAE. Messung der Prozentualen Anteile der Lymphozyten-Populationen mittels Durchflusszytometrie von *Trpm7<sup>+/+</sup>* (n=2) und *Trpm7<sup>R/R</sup>* (n=4) Mäuse nicht erkrankter Tiere. Die Ergebnisse wurden zur Kontrolle neben den Zellen des ZNS auch bei Zellen der Milz erhoben. Zu jedem Balkendiagramm (Mittelwert  $\pm$  SEM) wurde exemplarisch ein repräsentativer FACS Blot abgebildet. Die oberen Blots und Diagramme stellen jeweils die Ergebnisse aus dem ZNS dar, die unteren entsprechen den Ergebnissen aus der Milz. (A) Prozentualer Anteil an CD19<sup>+</sup> Zellen aller CD45<sup>+</sup> Zellen (B) Prozentualer Anteil der FoxP3<sup>+</sup> Zellen aller CD4<sup>+</sup> Zellen. ns  $P > 0,05$ , \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$**

Weder bei nicht erkrankten *Trpm7<sup>+/+</sup>* (n=2), noch bei den nicht erkrankten *Trpm7<sup>R/R</sup>* (n=4) Tieren, konnte für die Zellepopulationen FOXP3<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> weder im ZNS noch in der Milz ein Unterschied der prozentualen Anteile festgestellt werden (Abb. 11 A-B).



**Abbildung 12: Verminderte Migration exogener Vα3.2<sup>+</sup> T<sub>H</sub>17 Zellen ins ZNS nicht erkrankten *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tiere.**

Messung der Prozentualen Anteile der Lymphozyten-Populationen mittels Durchflusszytometrie von *Trpm7<sup>+/+</sup>* (n=2) und *Trpm7<sup>R/R</sup>* (n=4) Mäuse nicht erkrankter Tiere. Die Ergebnisse wurden zur Kontrolle neben den Zellen des ZNS auch bei Zellen der Milz erhoben. Zu jedem Balkendiagramm (Mittelwert ± SEM) wurde exemplarisch ein repräsentativer FACS Blot abgebildet. Die oberen Blots und Diagramme stellen jeweils die Ergebnisse aus dem ZNS dar, die Unteren entsprechen den Ergebnissen aus der Milz. (A) Prozentualer Anteil an Vα3.2<sup>+</sup> Zellen aller CD4<sup>+</sup> Zellen (B) Prozentualer Anteil der IL-17A<sup>+</sup>, INFγ<sup>+</sup> sowie doppelt positiver T-Zellen aller CD4<sup>+</sup> Zellen. ns P > 0,05, \* P ≤ 0,05, \*\* P ≤ 0,01.

Um die transferierten T-Zellen von den endogenen mauseigenen Zellen zu unterscheiden, wurde ein spezifischer exogener Marker (V $\alpha$ 3.2), der es uns ermöglicht die transferierten Zellen zu erkennen, mittels immunozytochemischer Färbung angefärbt. Und tatsächlich zeigt sich, dass im ZNS der nicht erkrankten *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäuse nahezu keine exogenen T<sub>H</sub>17 Zellen migrierten im Vergleich zu den nicht erkrankten *Trpm7<sup>+/+</sup>* Mäuse (Abb. 12 A). Für IL-17A<sup>+</sup> Zellen, INF $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen sowie doppelt positive für INF $\gamma$ /IL-17A Zellen im Gesamten, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden zwischen für *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tieren (Abb. 10B). Die transferierte Zellpopulation, bestand zu 70% aus T<sub>H</sub>17<sup>+</sup> Zellen. Durch die *in vitro* Differenzierung ist sie dennoch heterogen und enthält ebenfalls T<sub>H</sub>1- und undifferenzierte Zellen.

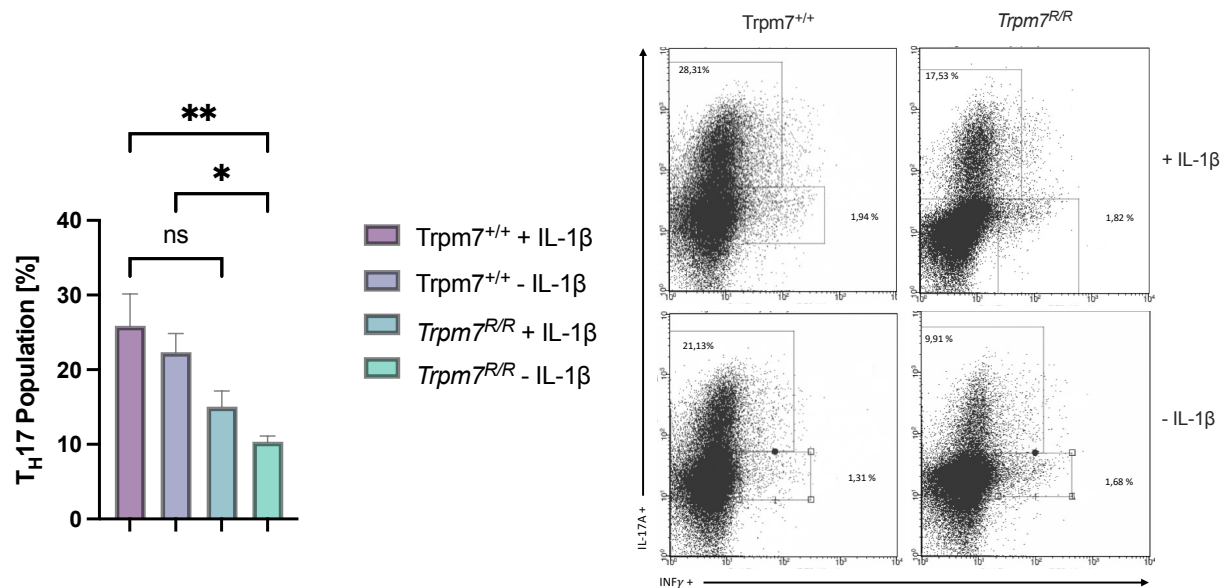
### 5.3 Differenzierungs- und Transkriptomanalyse von T<sub>H</sub>17 Populationen in *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Lymphozyten

Durch die Unterschiede *in vivo*, haben wir uns weiter gefragt, was dem auf Transkriptomebene zu Grunde liegt. Es wurde bereits gezeigt, dass unter Laborbedingungen, *Trpm7<sup>R/R</sup>* T-Zellen weniger gut in T<sub>H</sub>17 Zellen differenzieren können und so die Differenzierung in T<sub>reg</sub>-Zellen begünstigen [23].

#### 5.3.1 Vergleich der T<sub>H</sub>17-Zelldifferenzierung von *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* unter verschiedenen Bedingungen

Da wir in der aktiven EAE keine Unterschiede des T<sub>reg</sub>/T<sub>H</sub>17 Verhältnisses feststellen konnten und es Hinweise darauf gibt, dass IL-1 $\beta$ , welches durch PTx erhöht wird, die Differenzierung beeinflussen kann, haben wir vier Bedingungen zur Transkriptomanalyse gewählt. Die naiven T-Zellen von *Trpm7<sup>+/+</sup>* sowie *Trpm7<sup>R/R</sup>* wurden je mit und ohne IL-1 $\beta$  differenziert. Um uns an die *in vivo* Bedingung anzunähern, haben wir die Differenzierung ohne plattengebundene Antikörper, sondern mit Antigenpräsentierenden Zellen (APC) durchgeführt. Zur Überprüfung des Differenzierungserfolges wurden vor der Transkriptomanalyse jeder Probe ein Aliquot entnommen und es mittels Durchflusszytometrie gemessen. Es zeigte sich das *Trpm7<sup>R/R</sup>* Zellen ohne die Zugabe von IL-1 $\beta$  signifikant geringer in T<sub>H</sub>17 Zellen differenzieren, sowohl im Vergleich mit *Trpm7<sup>+/+</sup>* mit IL-1 $\beta$  als auch ohne IL-1 $\beta$ . Während hingegen die *Trpm7<sup>+/+</sup>* sowohl mit der Zugabe von IL-1 $\beta$  als auch ohne IL-1 $\beta$  problemlos in T<sub>H</sub>17 Zellen differenzieren können.

Die signifikant geringere Differenzierungsrate der *Trpm7<sup>R/R</sup>* T-Zellen kann durch die Zugabe von IL-1 $\beta$  kompensiert werden (Abb. 13).



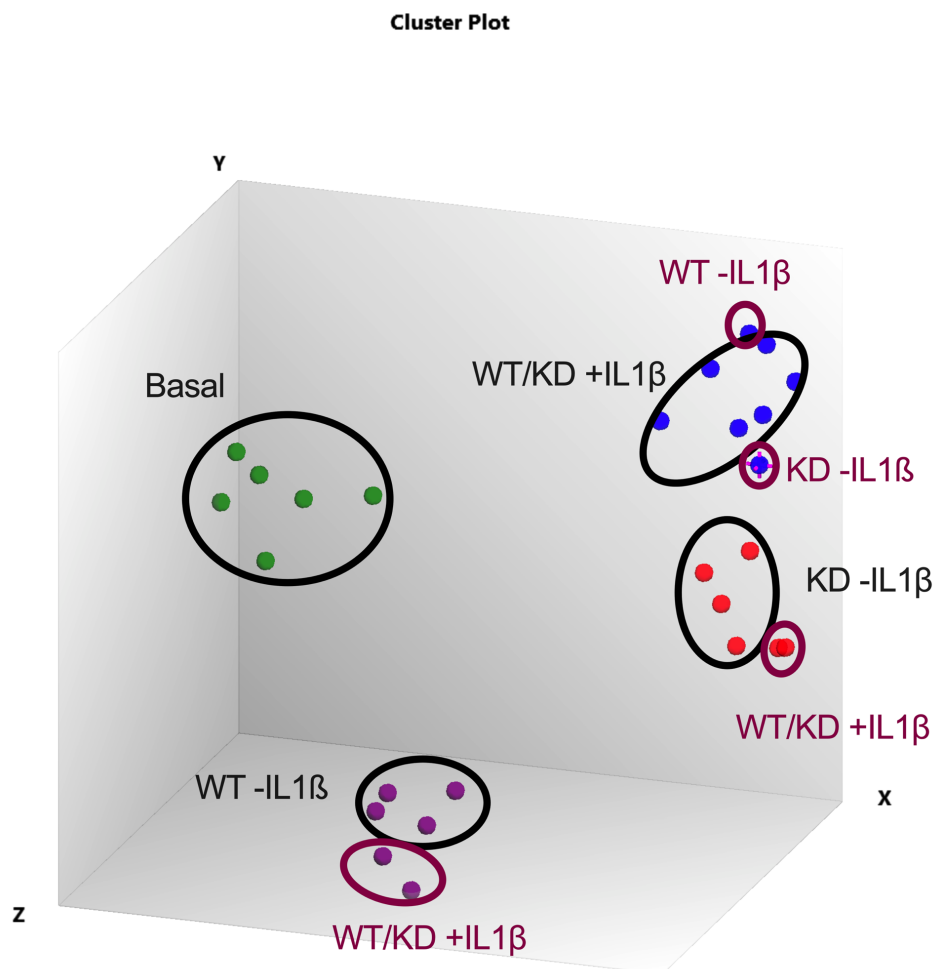
**Abbildung 13: *Trpm7<sup>R/R</sup>* Zellen benötigen IL-1 $\beta$  zur Differenzierung in TH17 Zellen.** *In vitro* Differenzierung naiver T-Zellen in TH17 Zellen, je von *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Zellen. Die naiven T-Zellen wurden mittels APC aktiviert, und entweder mit oder ohne den Zusatz von IL-1 $\beta$  kultiviert. Die Differenzierung wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil der TH17-Zellen, der vier unterschiedlichen Differenzierungsbedingungen. Daneben finden sich für alle Bedingungen je ein repräsentativere FACS-Blot der Ergebnisse. ns  $P > 0,05$ , \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$

### 5.3.2 Cluster Analyse der Genexpression unter den verschiedenen Differenzierungsbedingungen

Die *in vitro* Differenzierung wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Um grundsätzliche Unterschiede im Transkriptom der beiden Genotypen auszuschließen, wurden als Kontrolle naive T-Zellen analysiert. Diese werden im Weiteren als basal bezeichnet. Zur Überprüfung der zu erwartenden Cluster wurde eine Gruppierungsanalyse durch die TAC-Software durchgeführt. Diese teilt die Transkriptome der Einzelproben jeder Bedingung nach ihrer Nähe in Gruppen ein, und erlaubt so, erste Rückschlüsse auf Ähnlichkeiten und Unterschiede zu ziehen. Die in grün abgebildeten Punkte stellen das basale Cluster da (Abb. 14). Dieses beinhaltet alle Proben aus *Trpm7<sup>+/+</sup>* (WT für Wildtyp) und *Trpm7<sup>R/R</sup>* (KD für Kinasedefizient). Das blaue Cluster gruppiert je drei Proben aus *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>*, die



ohne IL-1 $\beta$  differenziert wurden. Je eine Probe von  $Trpm7^{+/+}$  und  $Trpm7^{R/R}$ , die ohne IL-1 $\beta$  differenziert wurden, positionieren sich nahe dem blauen Cluster und weichen so von ihren Hauptgruppen ab. Diese sind in rot, für  $Trpm7^{R/R}$  ohne IL-1 $\beta$ , und in lila, für  $Trpm7^{+/+}$  ohne IL-1 $\beta$ , abgebildet. Jede dieser Gruppen enthält je 4 der auf dieselbe Weise differenzierten Proben. An jedem dieser Cluster, rot und lila, sind je eine Probe von  $Trpm7^{+/+}$  und  $Trpm7^{R/R}$ , die mit IL-1 $\beta$  differenziert wurden, angesiedelt. Die Cluster entsprechen in Durchschnitt der erwarteten Cluster, die Abweichung einzelner Probe von ihrem Cluster ist im Rahmen einer natürlichen Varianz des Transkriptom (Abb. 14).



**Abbildung 14: Cluster Analyse zur Überprüfung der Gruppen nach Differenzierungsbedingung.** Die Eingruppierung in Cluster wurde durch die TAC-Software vorgenommen. Es wurden unter verschiedenen Bedingungen CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* in T<sub>H</sub>17 Zellen differenziert. Jeder Genotyp,  $Trpm7^{+/+}$  (WT) und  $Trpm7^{R/R}$  (KD), wurde jeweils mit und ohne die Zugabe von IL-1 $\beta$  differenziert (je n=5, die aus 19 Mäusen und 9 Differenzierungstagen gewonnen wurden). Zur Kontrolle sind naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen beider Genotypen analysiert worden (je n=3). Grünes Cluster, alle Proben der Kontrollen beider Genotypen. Blaues Cluster, je drei Proben beider Genotypen mit IL-1 $\beta$ . Rotes Cluster, vier Proben der  $Trpm7^{R/R}$  ohne IL-1 $\beta$ . Lila Cluster, vier Proben der

*Trpm7<sup>+/+</sup>* ohne IL-1 $\beta$ . Die in dunkelrot markierten Clustern zeigen nicht einzugruppierende Proben. Bedingungen der Analyse tSNE=5, Affinity=0,25.

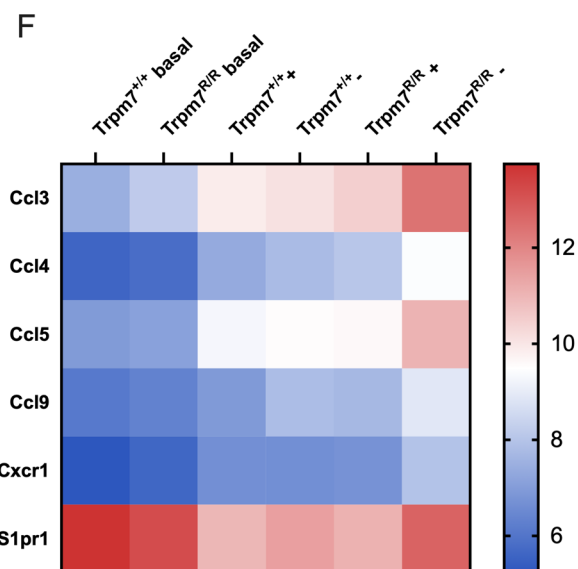
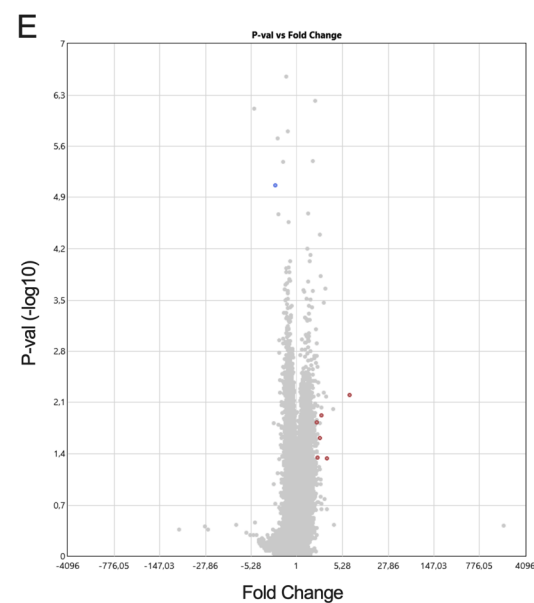
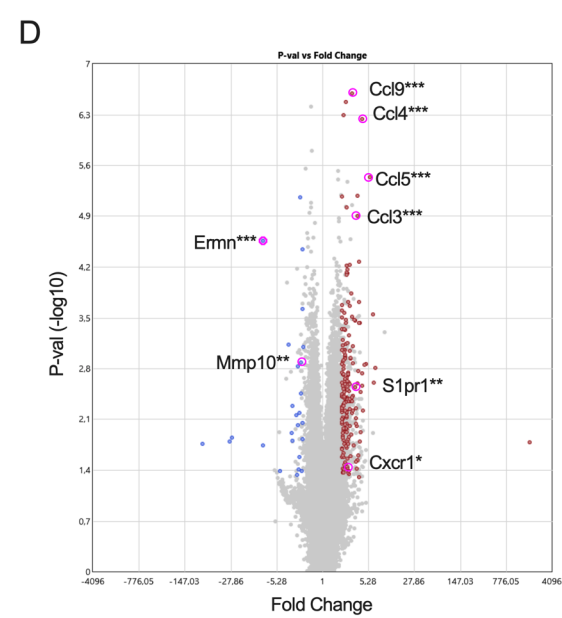
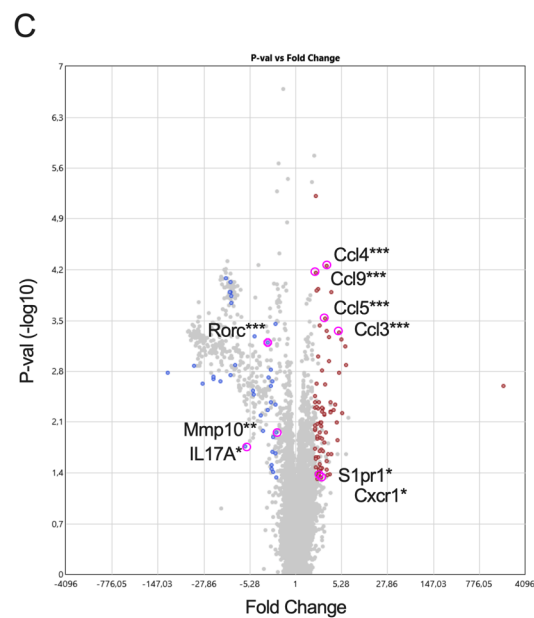
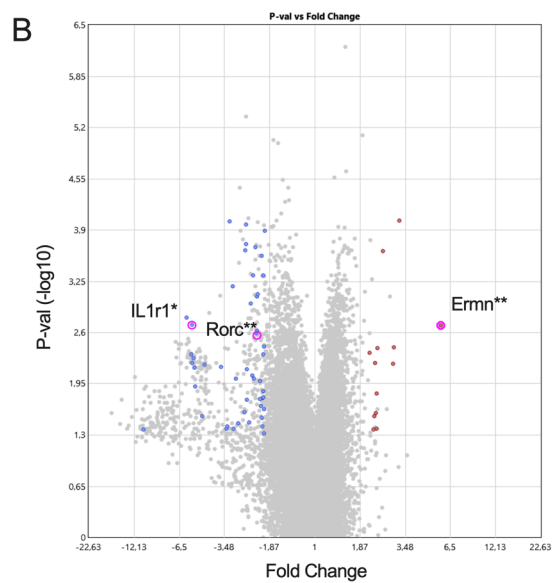
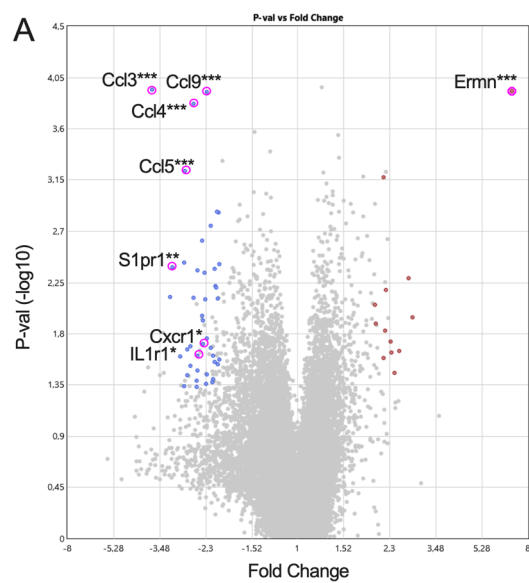
### 5.3.3 Transkriptomanalyse der T<sub>H</sub>17 Zellpopulationen von *Trpm7<sup>+/+</sup>* versus *Trpm7<sup>R/R</sup>*

Für den Vergleich des Transkriptoms der T<sub>H</sub>17 Zellen der *Trpm7<sup>R/R</sup>* die ohne IL-1 $\beta$  differenziert wurden mit dem Transkriptom der anderen Bedingungen, wurden Volcano Plots angefertigt. In diesen wurden alle Gene markiert und mit ihrer Signifikanz beschriftet. Für alle Vergleiche zeigt sich, dass in *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne IL-1 $\beta$  die Expression der Chemokine *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5* und *Ccl9*, sowie dem Rezeptor *Cxcr1* deutlich hochreguliert werden (Abb. 15 A-E). Zwar werden diese Gene in allen Bedingungen im Vergleich zu den Basalwerten hochreguliert, jedoch noch einmal hochsignifikant höher in *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne die Zugabe von IL-1 $\beta$ , im Vergleich zu den anderen drei Differenzierungsbedingungen (Abb. 15 A, C, D, E und Abb. 16 A-D).

Für das Gen *S1pr1* zeigt sich ein gegenteiliges Bild. Hier wird die Expression in allen Bedingungen herunterreguliert, jedoch nicht für *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne IL-1 $\beta$ . Hier bleibt die Expression ähnlich hoch wie bei den basalen Werten (Abb. 15 A-E Abb. 16 A-D).

Das Expressionslevel des Gen *Ermn* ist generell höher in allen Differenzierungsbedingungen, von *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* im Vergleich zu den basalen Werten. Im Vergleich der beiden Bedingungen ohne IL-1 $\beta$  zur jeweiligen Bedingung, die mit IL-1 $\beta$  differenziert wurden, ist jedoch eine weitere deutliche Hochregulation des Expressionslevels mit der Zugabe von IL-1 $\beta$  bei der Differenzierung zu verzeichnen (Abb. 15 und 16).

Eine ähnliche Regulation lässt sich beim IL1R1 erkennen. Auch dieser wird generell in allen Differenzierungsbedingungen hochreguliert, werden die Werte mit den jeweiligen basalen Werten verglichen. Jedoch wird der *Il1r1* in jenen Proben, jeweils bei *Trpm7<sup>+/+</sup>* sowie *Trpm7<sup>R/R</sup>*, die ohne IL-1 $\beta$  Zugabe differenziert wurden, nochmal höher exprimiert als in denen die mit IL-1 $\beta$  differenziert wurden (Abb. 16 E). Dieser ist aber nicht signifikant im Vergleich zu *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne IL-1 $\beta$  (Abb. 15 C und Abb. 16 E).



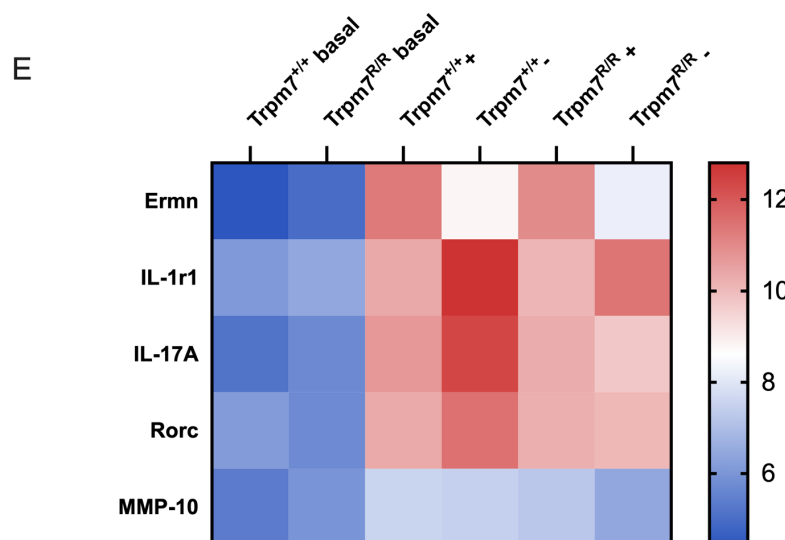
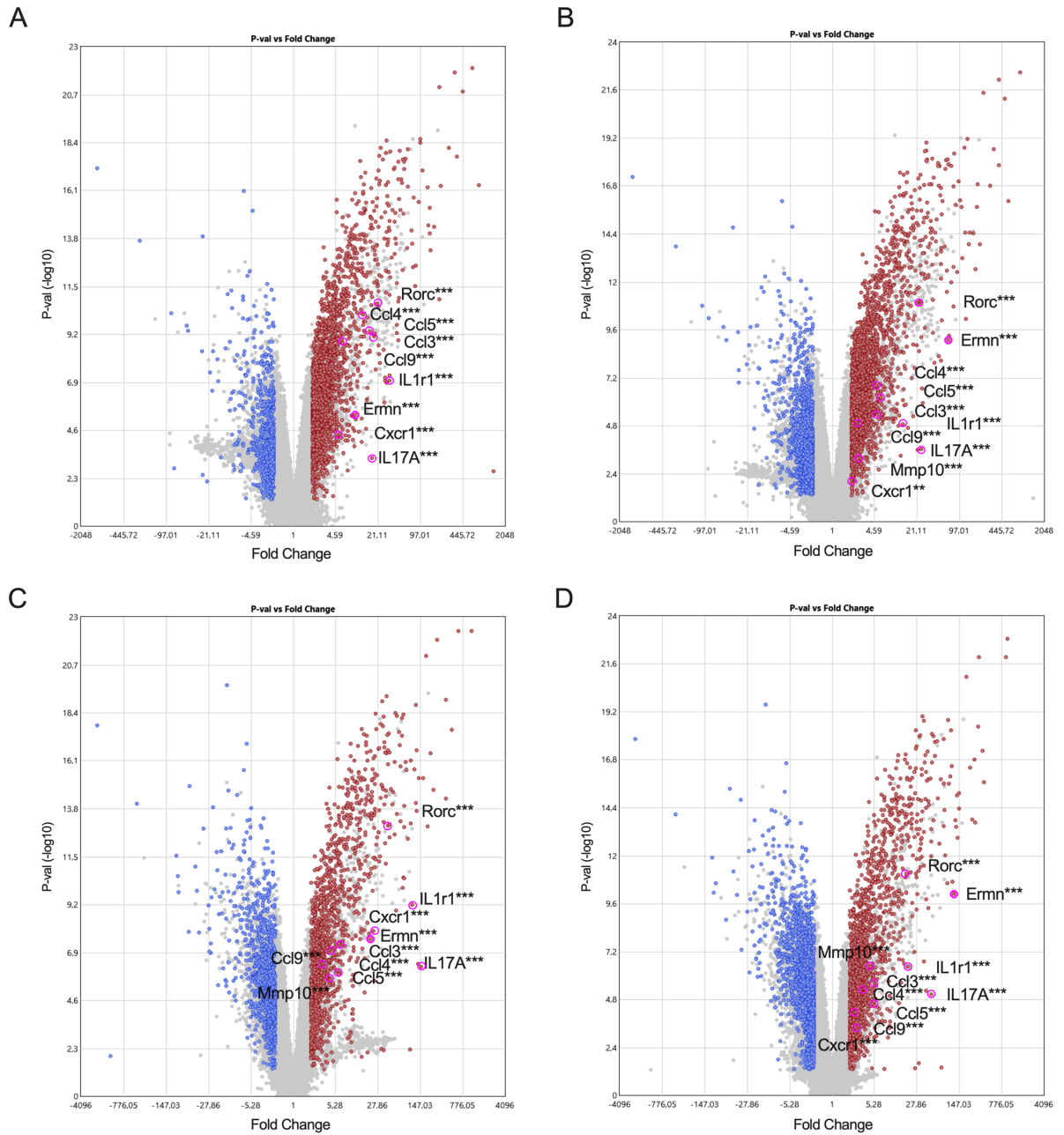
**Abbildung 15: Verändertes Transkriptom der *Trpm7<sup>R/R</sup>* T<sub>H</sub>17 Zellen differenziert ohne IL-1 $\beta$ , im Vergleich mit den anderen Differenzierungsbedingungen.** A-D) Zeigen Volcano-Blots, die die P-Werte gegenüber dem Fold-Change verschiedener Gene von je zwei Bedingungen abbildet. Rote Punkte zeigen hochregulierte Gene des Transkriptoms von *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne IL-1 $\beta$ , blau die herunterregulierten, im Vergleich zu den jeweiligen Bedingungen. Es werden nur kodierende Gene abgebildet. Ausgeschlossen wurden weiter alle Gene, die als prognostizierte Gene eingestuft wurden. A) Vergleich von *Trpm7<sup>R/R</sup>* mit und ohne IL-1 $\beta$  differenziert. B) Vergleich von *Trpm7<sup>+/+</sup>* mit und ohne IL-1 $\beta$  differenziert. C) Vergleich von *Trpm7<sup>R/R</sup>* mit *Trpm7<sup>+/+</sup>*, beide ohne IL-1 $\beta$  differenziert. D) Vergleich von *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne IL-1 $\beta$  differenziert, mit *Trpm7<sup>+/+</sup>* mit IL-1 $\beta$  differenziert. E) Vergleich von *Trpm7<sup>R/R</sup>* mit *Trpm7<sup>+/+</sup>*, beide mit IL-1 $\beta$  differenziert F) Zeigt eine Heatmap Darstellung des Expressionslevels (Avg (log2)) der vielversprechendsten Gene aller Bedingungen sowie der basalen Werte. Farbverlauf von blau, niedrigster Wert über weiß nach rot, höchster Wert. Es wurden insgesamt 19 Mäuse für 9 Differenzierungstagen verwendet. ns  $P > 0,05$ , \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ . Die Auswertung wurde mittels der TAC Software durchgeführt.

Für die beiden Gene *Il-17a* sowie *Rorc* ergibt sich ein ähnliches Bild. Beide Gene sind in allen Differenzierungsbedingungen hochreguliert, im Vergleich zu den jeweiligen Basalwerten von *Trpm7<sup>+/+</sup>* sowie *Trpm7<sup>R/R</sup>* Zellen. Noch einmal deutlich höher, ist das Expressionslevel für die Bedingung *Trpm7<sup>+/+</sup>*, die ohne IL-1 $\beta$  differenziert wurden, im Vergleich zu allen anderen Bedingungen (Abb. 16 E). Für *Il-17a* ist hierbei der Unterschied jedoch nur Signifikant für den Vergleich von *Trpm7<sup>+/+</sup>* ohne IL-1 $\beta$  mit den basalen Werten, mit *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne IL-1 $\beta$  sowie *Trpm7<sup>R/R</sup>* mit IL-1 $\beta$ . Der Vergleich der Expressionslevel für *Il-17a*, von *Trpm7<sup>+/+</sup>* mit IL-1 $\beta$  mit *Trpm7<sup>+/+</sup>* ohne IL-1 $\beta$ , ist jedoch nicht signifikant (Abb. 15 B, C und Abb. 16 C, E).

Aber auch für *Trpm7<sup>+/+</sup>* mit IL-1 $\beta$  ist das Expressionslevel höher als das für *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne IL-1 $\beta$ , jedoch nicht im Vergleich zu *Trpm7<sup>R/R</sup>* mit IL-1 $\beta$  (Abb. 15 C, D und Abb. 16 E).

Für *Rorc* ist das Expressionslevel für *Trpm7<sup>+/+</sup>* ohne IL-1 $\beta$  im Vergleich zu allen weiteren drei Differenzierungsbedingungen signifikant höher (Abb. 15 B, C und Abb. 16 E). Wie zu erwarten, ist die *Rorc*-Expression in den *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne IL-1 $\beta$  am niedrigsten.

Die *Mmp10* ist in beiden *Trpm7<sup>+/+</sup>* Bedingungen sowie der *Trpm7<sup>R/R</sup>* mit IL-1 $\beta$  gegenüber der basalen Werten signifikant höher (Abb. 16). Für *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne IL-1 $\beta$  jedoch, ist keine Steigerung des Expressionslevels zu registrieren (Abb. 16 A und E). Auch im Vergleich beider *Trpm7<sup>+/+</sup>* Bedingungen mit *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne IL-1, ist *Mmp10* signifikant höher (Abb. 16 C und D). Der direkte Vergleich der *Trpm7<sup>R/R</sup>* Bedingungen zeigt keine signifikanten Unterschiede (Abb. 15 A).



**Abbildung 16: Veränderungen im Transkriptom der T<sub>H</sub>17 Zellen, aus *Trpm7<sup>+/+</sup>* sowie *Trpm7<sup>R/R</sup>*, differenziert je mit und ohne IL-1 $\beta$ , im Vergleich zu ihren undifferenzierten basalen CD4<sup>+</sup> Zellen.** A-D) Zeigen Volcano-Blots, die die P-Werte gegenüber dem Fold-Change verschiedener Gene von je zwei Bedingungen abbildet. Rote Punkte zeigen hochregulierte Gene des Transkriptom, blau die herunterregulierten, im Vergleich der jeweiligen Bedingung. Es werden nur kodierende Gene abgebildet. Ausgeschlossen wurden weiter alle Gene die als prognostiziertes Gen eingestuft wurden. A) Vergleich von *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne IL-1 $\beta$  differenziert mit *Trpm7<sup>R/R</sup>* basal. B) Vergleich von *Trpm7<sup>+/+</sup>* mit IL-1 $\beta$  differenziert, mit *Trpm7<sup>R/R</sup>* basal. C) Vergleich von *Trpm7<sup>+/+</sup>* ohne IL-1 $\beta$  differenziert, mit *Trpm7<sup>+/+</sup>* basal. D) Vergleich von *Trpm7<sup>+/+</sup>* mit IL-1 $\beta$  differenziert, mit *Trpm7<sup>+/+</sup>* basal. E) Zeigt eine Heatmap Darstellung des Expressionslevels (Avg (log2)) der vielversprechendsten Gene aller Bedingungen sowie der basalen Werte. Rot höchster Wert, blau niedrigster Wert. Es wurden insgesamt 19 Mäuse verwendet. ns P > 0,05, \* P  $\leq$  0,05, \*\* P  $\leq$  0,01, \*\*\* P  $\leq$  0,001. Die Auswertung wurde mittels der TAC Software durchgeführt.

## 5.4 TRPM7-Strom-Messung von Patienten mit akuter MS

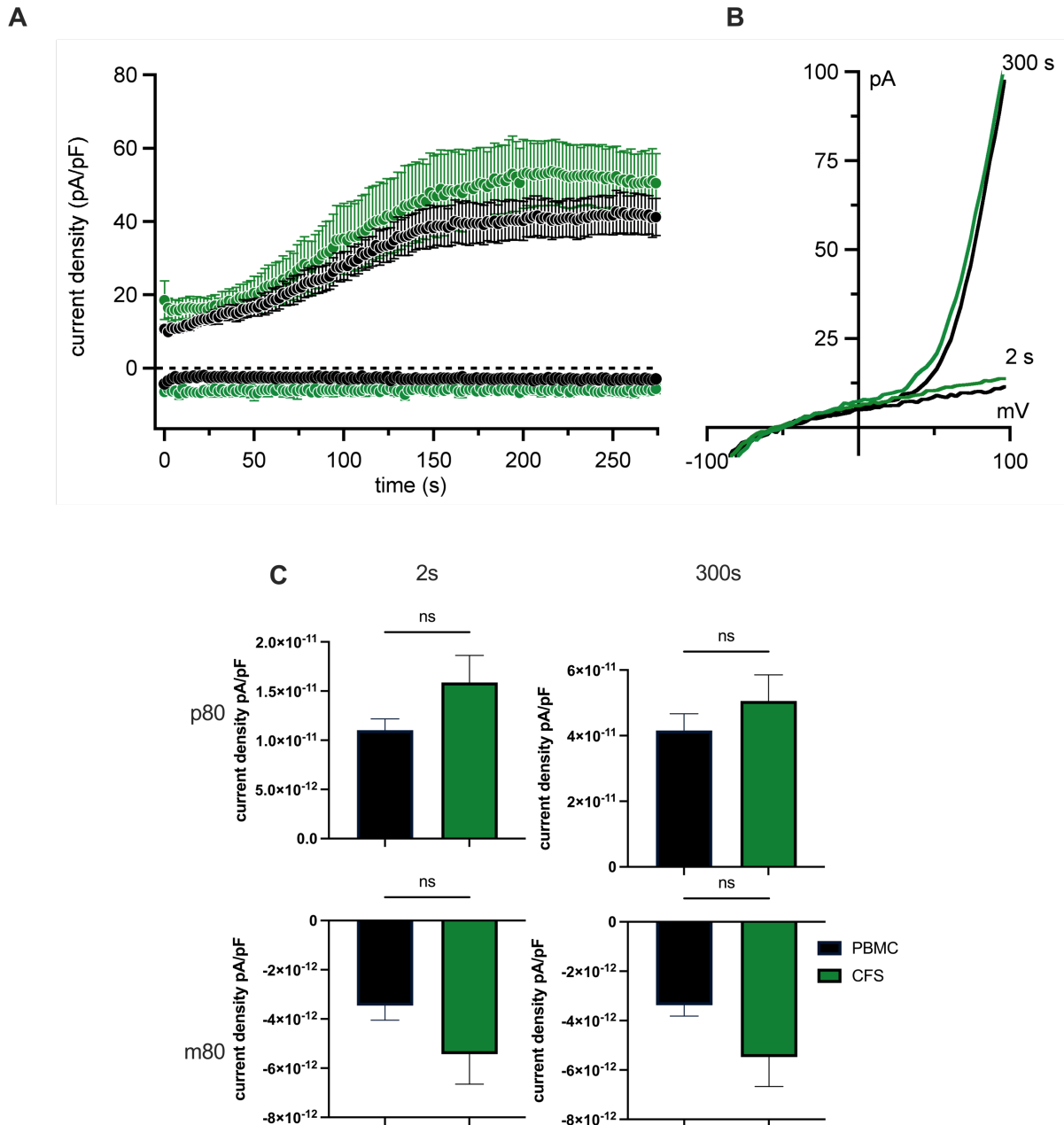
Um zu überprüfen, ob eine spätere Übertragung der aus den Tierversuchen gewonnener Erkenntnisse auf den Menschen möglich ist, wurde die Expression von TRPM7 in Lymphozyten, die aus dem Liquor von Patienten mit akuter MS gewonnen wurden, überprüft. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Lymphozyten, die aus dem Blut derselben Patienten gewonnen wurden, gemessen und die TRPM7-Ströme verglichen. Aus ethischen Gründen war es uns nicht möglich, Liquor Proben von Probanden ohne entzündliche Erkrankung des ZNS zu gewinnen, um diese mit den Liquor Proben von Patienten mit akuter MS zu vergleichen.

### 5.3.1 Patch-Clamp Daten aus Liquor Zellen sowie entsprechender T-Zellen aus dem Blut

Sowohl in Lymphozyten der Liquor Proben von Patienten mit akuter MS, als auch der Lymphozyten aus den Kontrollproben aus dem Blut dieser Patienten, konnte die funktionelle Expression von TRPM7 nachgewiesen werden. Die Dichte des einwärtsgerichteten (-80 mV) Stroms (pA/pF) zu Beginn der Messung (2 s), sowie auch am Ende der Messung (300 s) ist nicht signifikant höher in den Liquorzellen als im Vergleich zu den T-Zellen aus dem Blut (Abb. 17 C). Auch die Dichte des aufwärtsgerichteten Stroms ist zu keinem der beiden Zeitpunkte 2 s und 300 s signifikant höher in den Liquorzellen als im Vergleich zu den T-Zellen aus dem Blut (Abb. 17 C).

Es ist aber konstant eine tendenzielle höhere Stromdichte in den CSF Zellen zu messen. Sowohl zu Beginn (2 s), als auch am Ende der Messung (300 s) ist die Stromdichte höher in den Liquorzellen als im Vergleich zu den T-Zellen aus dem Blut.

Für eine valide Aussage muss jedoch die Messung der Proben eines weiteren Patienten abgewartet, der Mittelwert aller Messung gebildet und eine statistische Analyse durchgeführt werden. Durch die Limitation in der Probenbeschaffung von Liquor von Patienten mit akuter MS konnte das zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht abgewartet werden.



**Abbildung 17: TRPM7 exprimiert auf Lymphozyten, isoliert aus dem Liquor von Patienten mit akuter MS.** (A-C) Elektrophysiologische Messung der elektrischen Stromdichte (pA/pF) mittels der „Whole-Cell Patch Clamp“ Methode, sowie die repräsentative Darstellung der Strom/Spannungs-Beziehung (I-V) bei 2s und 300s. Die TRPM7-Ströme wurden über eine Spannungsrampe von -100 bis +100 mV innerhalb von 50 ms ausgelöst, dabei wird eine Haltepotential von 0 mV angelegt und zur Maximierung der Ströme eine  $Mg^{2+}$  freie externe Lösung mit 3mM  $Ca^{2+}$  verwendet. Gemessen wurden Lymphozyten aus dem Liquor von Patienten akuter MS ( $n_{\text{Zellen}}=4$ ), sowie zur Kontrolle die Lymphozyten aus dem Blut der gleichen Patienten ( $n_{\text{Zellen}}=10$ ). Insgesamt konnten Proben von zwei Patienten gemessen werden. (Grün) Ergebnisse aus dem Proben des Liquors; (Schwarz) Ergebnisse aus dem Proben des Blutes (C) Balkendiagramme der Auswärts- und Einwärts-Ströme, beider Patienten, bei 2s und 300s (Mittelwert  $\pm$  SEM). ns, nicht signifikant  $P>0,05$ , \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$



## 6. Diskussion

Wir konnten in dieser Arbeit viele neue Erkenntnisse der Auswirkung der TRPM7-Kinase in den verschiedenen Prozessen der pro- und anti-inflammatorischen Effekte der T-Lymphozyten bei der EAE gewinnen. Die TRPM7-Kinase hat erst nach der Aktivierung der T-Lymphozyten Einfluss auf deren Polarisierung, den naiven Zustand und dessen Homöostase im ZNS. Wird zusätzlich zur normalen Aktivierung der T-Zellen der IL-1 $\beta$  Signalweg überstimuliert, wie durch das PTx, wird der anti-inflammatorische Effekt der *Trpm7<sup>R/R</sup>* überlagert. In der passiven EAE war die Inzidenz für die *Trpm7<sup>R/R</sup>* signifikant reduziert, deutlich weniger Tiere entwickelten Symptome. Dies wird möglicherweise über eine besondere Kombination von Chemokinen gesteuert.

### 6.1 TRPM7-Kinase im ZNS gesunder Tiere

Unter normalen physiologischen Bedingungen ist das zentrale Nervensystem ein weitestgehend immunzellfreier Raum. Nur wenige Lymphozyten passieren grundlos die Bluthirnschranke, auch wenn ein Austausch der Hirnhäute mit den peripheren Lymphozyten stattfindet [171, 172]. Lymphozyten sind nicht immer pathogener Natur, wenn sie im ZNS gefunden werden. Vielmehr konnte in den letzten Jahren der Forschung gezeigt werden, dass allen voran Gedächtniszellen, Teil der ZNS Homöostase sind [173].

TRPM7 konnte in der Vergangenheit in verschiedenen Bereichen mit dem Immunsystem assoziiert werden. Dabei nimmt die Kinase eine wichtige Rolle in der T-Zelldifferenzierung, sowie der Besiedlung des Darms alloreaktiver T-Zellen in GvHD ein [23]. Die Bedeutung der TRPM7-Kinase bei der Migration von Lymphozyten in das ZNS ist unbekannt. Die Versuche aus 5.1.1 zeigen, dass in unstimulierten Mäusen, die einen gesunden Phänotyp darstellen, keine Unterschiede wahrzunehmen sind. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist die Kinase also nicht am Migrationsverhalten der Lymphozyten in das ZNS beteiligt. Sowohl im ZNS der *Trpm7<sup>+/+</sup>* als auch im ZNS der *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäuse ist eine gleichermaßen geringe Anzahl an Lymphozyten zu detektieren. Auch was den Phänotyp der Lymphozyten betrifft, hat die Kinase keinen Einfluss bei gesunden Tieren. Die gefundenen Lymphozyten-Populationen unterscheiden sich nicht in ihrer Zusammensetzung. Auch die Einordnung des Transkriptoms zeigt, dass auf Expressionsebene kein Unterschied zwischen der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten von *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* festzustellen ist. Das Transkriptom beider Genotypen wird automatisch

zu einem gemeinsamen Cluster zusammengeführt. Die Ähnlichkeit der beiden Transkriptome ist so groß, dass keine Veränderung wahrgenommen wird. Die Kinase scheint also erst nach der Aktivierung der Lymphozyten Einfluss auf deren Polarisierung und dessen Migrationsverhalten zu haben.

## 6.2 TRPM7-Kinase in der aktiven EAE

In der aktiven EAE werden mehrere Stimuli verwendet, um die Krankheit in den Tieren auszulösen, neben dem Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein, MOG, kommt beispielsweise auch das Pertussis Toxin zum Einsatz. Das MOG-Peptid löst eine Immunantwort durch T-Helfer Zellen aus, die infolgedessen produzierten Antikörper gegen MOG führen im weiteren Verlauf zu Läsionen im ZNS. Das Pertussis Toxin ist ein vom Erreger des Keuchhustens *Bordetella pertussis* produziertes Exotoxin. Als zusätzlicher Aktivator der T-Zellen erleichtert es die Induktion einer EAE. Durch die Inaktivierung von regulatorischen G-Proteinen, stört es die Signaltransduktion von Zellen. Es ist bekannt, dass das Toxin über eben jenen Mechanismus Kanäle moduliert und deren Ströme und Funktion verändert oder gar blockiert [174, 175].

Zur vollständigen Funktion benötigt die TRPM7-Kinase  $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ , diese Kationen erhält sie durch die Kanalpore. Ist also der Kanal blockiert, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass auch die Kinasefunktion beeinträchtigt ist. Wir konnten zeigen, dass das Pertussis Toxin keinen Einfluss auf die TRPM7-Ströme hat und damit auch keine modulierende oder gar blockierende Wirkung auf TRPM7. Dennoch konnten wir keinen Effekt der TRPM7-Kinase bei der aktiven EAE *in vivo* feststellen, sowohl die *Trpm7<sup>+/+</sup>* also auch *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tiere erkrankten gleichermaßen häufig und schwer. Trotz des unterstützenden Charakters der Kinasesignaltransduktion bei der akuten GvHD, eine ebenfalls durch  $T_H17$  Zellen geförderte Erkrankung, konnte keine Kinasebeteiligung bei der aktiven EAE gezeigt werden. Die TRPM7-Kinase kontrolliert über die TGF- $\beta$  induzierte pro-inflammatorische  $T_H17$  Helferzellen über die SMAD2 Modulation, dabei hat sie aber keinen Effekt auf die Differenzierung der regulatorischen T-Zellen [23]. Die EAE stellte ein Tiermodell der MS dar, an deren Entwicklung und Fortschreiten der Erkrankung pro-entzündliche T-Zellen maßgeblich sind. Dass die TRPM7-Kinase auch an diesen Differenzierungsprozessen beteiligt ist, erschien plausibel, dennoch konnten klinisch keine Effekte nachgewiesen werden.

Interessanterweise zeigte sich aber bei der aktiven EAE *ex vivo*, dass die Effekte der Kinase nicht etwa in der T-Zelldifferenzierung, sondern der Migration von B-Zellen in das ZNS lagen.

Es scheint, als ob die Kinase die Migration der B-Zellen verhindert. Ob dem B-Zell oder T-Zell abhängige Prozesse zu Grunde liegen, kann mit den Versuchen der aktiven EAE nicht abschließend geklärt werden. Mit Hilfe der passiven EAE wollten wir weiter untersuchen, ob der Effekt der Kinase auf die Migration von B-Zellen in das ZNS abhängig von T-Zellen ist. Beim adoptiven Transfer von T-Zellen bei der passiven EAE wird die Erkrankung über extern differenzierte T<sub>H</sub>17 Zellen ausgelöst. Diese tragen keine Mutation in der TRPM7-Kinase. Die vermehrte Migration aus der aktiven EAE konnte in den Versuchen der passiven EAE nicht wiederholt werden. Da die transferierten T<sub>H</sub>17 Zellen hierbei in den *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäusen nun ebenfalls eine intakte Kinase tragen, und keine erhöhte B-Zell-Rekrutierung in das ZNS stattgefunden hat, ist ein B-Zell-abhängiger Effekt unwahrscheinlich. Die B-Zellen der *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäuse, haben ungeachtet der T-Zellen weiterhin keine Kinaseaktivität. Würde also die Kinaseaktivität innerhalb der B-Lymphozyten die Migration in das ZNS verhindern, sollten wir auch in der passiven EAE eine größere Population im ZNS der *Trpm7<sup>R/R</sup>* Kohorte feststellen können. Daher liegt die Annahme nahe, dass die Kinaseaktivität in den T-Zellen eine vermehrte B-Zellen-Rekrutierung verhindern können. B-Zellen können in der EAE sowohl positive als auch negative Einflüsse haben. In erster Linie aber tragen sie durch die Produktion von Anti-Myelin Antikörpern zur Pathogenese der EAE bei. In einem späteren Krankheitsverlauf aber können B-Zellen auch positive Effekte beim spontanen „recover“ der Erkrankung haben. Ohne B-Lymphozyten sind Mäuse nicht fähig sich von der EAE zu erholen. [176, 177].

Es lässt sich in dieser Studie nicht feststellen um welche B-Zellpopulation es sich bei den hier detektierten B-Zellen handelt.

Um dies zu klären, bedarf es weiterer Experimente und der Verwendung spezifischer Marker, um die genaue Subpopulation und Funktion der *Trpm7<sup>R/R</sup>* B-Lymphozyten zu ermitteln.

### 6.3 IL-1 $\beta$ Stimulation überlagert die anti-inflammatorischen Effekte der *Trpm7<sup>R/R</sup>*

Aufgrund der Ergebnisse aus der aktiven EAE stellten wir uns die Frage, wieso trotz der positiven Prognose aus den Erkenntnissen der Effekte der TRPM7-Kinase bei der GvHD keine klinischen Effekte zu sehen sind. Die GvHD ist eine der häufigsten Nebenwirkung der hämatopoetischen Stammzelltransplantation. Bei dieser Immunreaktion erkennen die Spender T-Zellen das Leukozytenantigen des Empfängers als fremd und lösen eine

Immunreaktion aus. Hierbei werden vor allem pro-entzündliche T<sub>H</sub>17 Zellen aktiviert, die im weiteren Verlauf zu Gewebeschädigungen führen [178].

Jüngste Forschungsergebnisse zeigten, dass die TRPM7-Kinaseaktivität eine GvHD begünstigt oder sogar fördert. Die genetische Inaktivierung der Kinasefunktion aber verhindert die Entwicklung einer GvHD. In der multiplen Sklerose spielen ebenfalls T<sub>H</sub>17 Zellen eine entscheidende Rolle. Wir gehen daher von der Annahme aus, dass auch hier durch die Inhibition der Kinase-Aktivität ähnliche Effekte zu erzielen sind.

Bei der Entwicklung der T-Zelle aus ihrem naiven Zustand in eine der Effektorzellen sind mehrere Signalwege und Prozesse beteiligt. Die Differenzierung in T<sub>H</sub>17 und T<sub>reg</sub> Zellen wird über den TGF- $\beta$  Signalweg reguliert. Die TRPM7-Kinase reguliert dabei die SMAD2 Phosphorylierung und fördert so die Differenzierung in den pro-entzündlichen Phänotyp der T<sub>H</sub>17 Zellen. Die Inaktivierung der Kinasefunktion vermindert die Fähigkeit der T-Zellen in T<sub>H</sub>17 Zellen zu differenzieren, wie die *in vitro* Differenzierungsversuche zeigen. Dabei bleibt aber die Differenzierung in die anti-inflammatorischen T<sub>reg</sub> Zellen unbeeinflusst [23]. Dieser Umstand ermöglicht eine neue potentielle Therapiestrategie bei Erkrankungen, bei dessen Entstehung und Progression T<sub>H</sub>17 Zellen maßgeblich beteiligt sind. Aktuelle Immuntherapien führen zur Immunsuppression und beeinträchtigen nicht nur spezifische die pro-entzündlichen Effektor Lymphozyten, sondern auch die regulatorischen Effektor-Lymphozyten und bewirken somit die vollständige Unterdrückung der Immunantwort. Durch die Inaktivierung der Kinase jedoch wird lediglich der Teil des Immunsystems inhibiert, der auch für einen schweren Verlauf der Erkrankung maßgeblich verantwortlich ist. Durch die Inhibition der Kinasefunktion ist eine Verlagerung des T<sub>H</sub>17/T<sub>reg</sub> Verhältnisse hin zu der anti-inflammatorischen Seite zu erwarten. Überraschenderweise aber waren für beide Gruppen *Trpm7<sup>+/+</sup>* sowie *Trpm7<sup>R/R</sup>*, in der *ex vivo* Analyse die Größe der T<sub>reg</sub> Population bei der aktiven EAE gleich. Möglicherweise wird auch hier der positive Effekt einer Kinaseinaktivierung durch das Pertussis Toxin überlagert. Frühere Studien konnten zeigen, dass das Pertussis Toxin die Anzahl an FOXP3<sup>+</sup> Zellen in der Milz reduziert [168]. Ein ähnlicher Effekt kann bei unseren Versuchen zum Tragen kommen. Durch die Immunisierung mittels dem Pertussis Toxin wird zusätzlich die Ausbildung in T<sub>reg</sub> Zellen vermindert. Der mögliche Effekt durch die genetische Inhibition der Kinase wird überlagert.

Nach der Differenzierung der Zellen folgt deren Expansion. Dieser Prozess wird in T-Lymphozyten unter anderem über den IL-1 $\beta$  Signalweg reguliert [178]. Durch das Pertussis Toxin, welches zur zusätzlichen Immunisierung der Tiere bei der aktiven EAE zum Einsatz kommt, wird ebenfalls der IL-1 $\beta$  Signalweg aktiviert und führt zur starken Sekretion des IL-1 $\beta$  durch myeloide Zellen [179]. Da die Differenzierung in T<sub>H</sub>17 durch die inaktive Kinase nicht vollständig unterdrückt wird, sondern signifikant reduziert ist, können die *Trpm7<sup>R/R</sup>* T-Zellen durch ein starkes IL-1 $\beta$  Signal auch expandieren. *In vitro* konnten wir zeigen, dass durch die externe Zugabe von IL-1 $\beta$  die verminderte T<sub>H</sub>17 Differenzierung der *Trpm7<sup>R/R</sup>* gegenüber *Trpm7<sup>+/+</sup>* kompensiert werden kann. Während für die *Trpm7<sup>+/+</sup>* T-Zellen kein Kompensator nötig ist, sowohl mit als auch ohne die Zugabe von IL-1 $\beta$ , waren diese Zellen gleichermaßen in der Lage zu differenzieren. Die Transkriptomanalyse der Differenzierungsbedingungen bestätigt dies ebenfalls. Für beide Genotypen *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* die ohne IL-1 $\beta$  differenziert wurden, wurde der IL-1 Rezeptor hochreguliert, im Vergleich beider Genotypen die ohne IL-1 $\beta$  differenziert wurden. Durch die zusätzliche Immunisierung mit Pertussis Toxin wird bei der aktiven EAE, der anti-inflammatorische Effekt der Kinasedefizienz überlagert. Die Aktivierung des IL-1 $\beta$  Signalwegs und der dadurch folgenden Ausschüttung des Interleukin 1 $\beta$  durch das Pertussis Toxin scheint ein zu starker Stimulus zu sein.

IL-1 $\beta$  steht schon länger im Zusammenhang mit autoimmunen und chronisch entzündlichen Erkrankungen [180]. Ein IL-1R Antagonist, Anakinra, wird bereits erfolgreich für die Behandlung eines weiten Spektrums an Erkrankungen eingesetzt, darunter auch Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, dem Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrom (CAPS) oder dem Still-Syndrom [181-183]. Auch der humane monoklonale Antikörper Canakinumab, der sich gegen IL-1 $\beta$  richtet, wird erfolgreich bei der Behandlung von CAPS oder dem Muckle-Wells-Syndrom eingesetzt [184, 185].

Bei der Progression der MS spielt die Demyelinisierung der Nervenbahnen eine entscheidende Rolle. Frühere Studien konnten zeigen, dass IL-1 $\beta$  die Demyelinisierung induzieren kann [186, 187]. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang zu unseren Ergebnissen aus der Transkriptionsanalyse der unter verschiedenen Bedingungen *in vitro* differenzierten T<sub>H</sub>17 Zellen. Sowohl in den *Trpm7<sup>+/+</sup>* als auch der *Trpm7<sup>R/R</sup>* Zellen, die mit der Zugabe von IL-1 $\beta$  differenziert wurden, zeigte sich eine stark hochregulierte Expression des Gens *Ermn*, nicht

aber in den Bedingungen ohne IL-1 $\beta$ . ERMN gehört zu der Familie der Ezrin-radixin-moesine, ist ein Protein des Zytoskeletts und ist als spezifischer Marker für Oligodendrozyten bekannt. ERMN ist von großer Bedeutung für die Integrität der Myelinscheide und wird hauptsächlich in Oligodendrozyten exprimiert [188]. Es wurde eine lange Zeit angenommen, die Expression von *Ernm* beschränke sich auf Oligodendrozyten, aber Forscher haben die *Ernm*-Expression auch in Leukozyten nachgewiesen, was wir mit unseren Ergebnissen bestätigen können. Die genaue Rolle von *Ernm* in Leukozyten bedarf allerdings weiterer Forschung, denn die genaue Funktion ist noch nicht geklärt [189]. In der RR-MS wird die Reduktion der *Ernm*-Expression als mögliche Ursache des Demyelinisierungsprozesse vermutet [190]. Möglicherweise führt in unseren Versuchen die hohe Konzentration von IL-1 $\beta$  bei der Differenzierung zu Veränderungen des Zytoskeletts, weswegen eine Stabilisierung durch die vermehrte Expression von *Ernm* erreicht werden kann. Im Verlaufe der Krankheit könnten die Zellen möglicherweise nicht mehr in der Lage sein die Stabilität aufrecht zu erhalten bzw. zu erneuern. Welche genauen Mechanismen dafür verantwortlich sind, muss erst geklärt werden, aber dadurch wird der potentielle Einfluss des IL-1 $\beta$  weiter deutlich.

Trotz der bereits zugelassen Medikamente wurde IL-1 $\beta$  als direkte pharmakologische Zielstruktur jedoch noch nicht bei MS getestet, obwohl es nicht möglich ist in *IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup>* defizienten Mäusen eine normale EAE auszulösen [179]. Neben seinen pro-inflammatorischen Eigenschaften ist IL-1 $\beta$  im ZNS auch an Prozessen wie Gewebeumstrukturierung und Reparatur sowie Neuroprotektion beteiligt. Dieser Umstand macht IL-1 $\beta$  im Zusammenhang mit MS zu einer sehr umstrittenen Zielstruktur [191].

Interessanterweise zeigte eine Doppelblindstudie, dass Interleukin-1 Blocker ineffektiv für die Behandlung der GvHD sind [192]. Obwohl auch hier pro-entzündliche T<sub>H</sub>17 Zellen hauptverantwortlich für die Entwicklung der Erkrankung sind, scheint die Therapie mittels IL-1 $\beta$  fehlzuschlagen. Das, sowie die möglichen Nebeneffekte durch die Behandlung von MS mittels IL-1 $\beta$  Blocker, macht die TRPM7 Kinase zu einer neuen wichtigen pharmakologischen Zielstruktur. Ein Nachweis, dass bei der Pathogenese der MS ein starker IL-1 $\beta$  Stimulus wie das Pertussis Toxin existiert, gibt es nicht [191]. Ohne die Induktion des IL-1 $\beta$  Signalwegs durch das Pertussis Toxin, ist der Effekt der Inhibition der TRPM7-Kinase anti-inflammatorisch. Zusätzlich wird die Differenzierung in regulatorische T-Zellen nicht beeinträchtigt. Das führt

uns zu einer positiven Prognose für die Effektivität der Kinase-Inhibition bei der Behandlung der MS.

#### 6.4. TRPM7-Kinaseinaktivierung führt zu einem milderen Krankheitsverlauf der passiven EAE

Da scheinbar durch die Immunisierung mittels Pertussis Toxin keine anti-inflammatorischen Effekte durch die genetische Depletion der TRPM7-Kinase zu sehen war, haben wir eine weniger aggressive Immunisierungsform eingesetzt. Bei der passiven EAE mittels adoptiven Transfer werden bereits MOG-spezifischen T-Zellen *in vitro* in T<sub>H</sub>17 Zellen differenziert und den Versuchstieren injiziert. Dadurch wird die zusätzliche Induktion des IL-1 $\beta$  Signalweges ausgeschlossen. Und tatsächlich konnten wir nun einen deutlichen klinischen Effekt in den *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäusen feststellen. Nur 2 der insgesamt 12 *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tiere zeigten überhaupt Symptome, wohingegen bei den *Trpm7<sup>+/+</sup>* Mäusen 8 der 12 Versuchstiere erkrankten. Darüber hinaus fallen die Symptome bei den erkrankten *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tieren deutlich milder aus, als in der Wildtyp Gruppe. Selbst wenn also Tiere ohne Kinaseaktivität krank werden, ist der Verlauf der Erkrankung als weniger aggressiv anzunehmen. Möglicherweise haben die Tiere geringere motorische Symptome, da durch die Kinaseinaktivierung weniger Schäden der Myelinscheide stattfinden.

Interessanterweise konnten wir nun, da der IL-1 $\beta$  Signalweg nicht zusätzlich aktiviert wurde, zeigen, dass in Kinase-defizienten Mäusen tatsächlich eine größere Anzahl an T<sub>reg</sub>-Zellen in das ZNS migrieren. Wie wichtig die regulatorischen T-Lymphozyten für die Therapie und Prognose von multipler Sklerose sind, zeigen gezielte Deletionen der T<sub>reg</sub>-Zellen in Mäusen. Diese Tiere entwickeln spontane Autoimmunerkrankungen. T<sub>reg</sub>-Zellen würden unter normalen physiologischen Bedingungen die Anzahl und Funktionen autoimmuner T-Zellen stark regulieren. Diese regulatorische Fähigkeit scheint in MS Patienten fehlgeleitet zu sein. Durch die Inaktivierung der Kinasefunktion lassen sich also gleich an zwei Seiten der Autoimmunität angreifen. Die Differenzierung in T<sub>H</sub>17 Zellen würde stark verringert, während die der T<sub>reg</sub> Zellen unbeeinflusst bleibt. Somit entsteht ein umgedrehtes Verhältnis beider Populationen zu der anti-inflammatorischen Seite. T<sub>reg</sub> Zellen im ZNS haben dann direkt anti-inflammatorische und ZNS-schützende Eigenschaften am benötigten Ort. Darüber hinaus

scheinen  $T_{reg}$  Zellen im ZNS Einfluss auf die Abschwächung der motorischen Symptome zu haben [152, 193].

Frühe Studien mit FTY720, einer chemisch modifizierten Substanz aus dem Pilzderivat Myriocin, zeigten deren Fähigkeit eine Lymphopenie auszulösen. Die Entdeckung, dass dieser Mechanismus über die S1P Signalweiterleitung reguliert wird, weckte das Interesse der Immunologen. Heute ist Fingolimod, wie das entsprechende Medikament heißt, eines der ersten Therapiemöglichkeiten in der Behandlung von RR-MS [194].

Damit T-Lymphozyten ihre sekundären Lymphorgane verlassen, müssen sie einem chemotaktischen Konzentrationsgradienten des S1P folgen, der zwischen den Lymphknoten und dem Blut besteht. Die Konzentration von S1P ist dabei im Blut höher, wenn die T-Zellen dann S1PR auf der Oberfläche exprimieren, migrieren diese nach Aktivierung des S1PR aus dem Lymphgewebe aus und gelangen in den Blutkreislauf. Bei aktivierten Effektor-T-Zellen wird im ersten Moment die Expression des S1PR unterdrückt, die Zellen reagieren nicht auf den S1P-Gradienten und verbleiben erstmal in den Lymphorganen. Erst nach einigen Tagen der Proliferation wandern diese aus. Durch die Einnahme von Fingolimod werden Lymphozyten an der Auswanderung aus den Lymphgeweben gehindert und somit eine Immunantwort gehemmt [194-196].

Durch diese Immunsuppression werden Patienten anfällig für Infektionen, da das Immunsystem keine zirkulierenden T-Zellen mehr besitzt. Eine Therapie, bei der nur die pro-inflammatorischen autoimmunen Zellen unterdrückt werden, wäre also ein enormer Fortschritt in der Behandlung von MS Patienten. In der Transkriptionsanalyse konnten wir sehen, dass bei der Differenzierung der *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne IL-1 $\beta$ , die S1PR Expression nicht unterdrückt wird. Diese Zellen wären also sofort in der Lage aus den Lymphorganen auszuwandern. Gegenüber den gängigen Medikamenten, wie eben S1P Modulatoren, wäre das ein enormer Fortschritt. Die gezielte Inhibition der pro-entzündlichen Effektorzellen, ohne aber die regulatorischen positiven Effektorzellen zu beeinträchtigen, bringt viele neue Vorteile mit sich.

Ein weiterer denkbarer Einfluss der Kinase im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen ist der Einfluss auf die Blut-Hirn-Schranke. Bei der *ex vivo* Untersuchung der nicht erkrankten Tiere konnten wir feststellen, dass die Kinase die Einwanderung der adaptiv transferierten Zellen in das ZNS fördert. In den gesunden *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tiere wurden nahezu keine



T<sub>H</sub>17 Zellen detektiert, wohingegen in den nicht erkrankten *Trpm7<sup>+/+</sup>* Tieren 20 % aller CD 4<sup>+</sup> T-Zellen, T<sub>H</sub>17 Zellen sind. Bei der Kontrolle der Milz jedoch wurde deutlich, dass die Populationen für beide Genotypen gleich groß sind. Die Anzahl der T<sub>H</sub>17 Zellen in den Tieren waren in der Peripherie gleich groß, die T<sub>H</sub>17 Zellen konnten die BHS in den nicht erkrankten *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tieren jedoch nicht überwinden. Anscheinend wird also eine aktive Kinase benötigt um die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Dafür spricht auch die Expression der Matrix-Metallo-Protease-10 (MMP-10, Stromelysin-2). Diese wird in *Trpm7<sup>R/R</sup>*, die ohne IL-1 $\beta$  differenziert werden, im Vergleich zum Basalwert nicht hochreguliert. Jedoch wird unter den drei anderen Differenzierungsbedingungen das *Mmp-10* vermehrt exprimiert. In neurodegenerativen Erkrankungen ist ein entscheidender Mechanismus des neuronalen Zelltods, die Trennung der neuronalen Zellen von der extrazellulären Matrix durch den „tissue plasminogen activator“ tPA erzeugtem Plasmin. Bei MS gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang von tPA an der Demyelinisierung [197] und MMP-10 steht im Verdacht die die Aktivität des tPA zu verstärken[198]. Ausgehend von unseren Ergebnissen spricht vieles für die Beteiligung von MMP-10 an der Demyelinisierung. Bei der *in vitro* Differenzierung konnten wir für *Trpm7<sup>+/+</sup>* T-Zellen, mit und ohne IL-1 $\beta$ , sowie bei *Trpm7<sup>R/R</sup>* mit IL-1 $\beta$  eine vermehrte *Mmp-10* Expression feststellen, nicht aber für *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne IL-1 $\beta$ . Geht man von der Theorie aus, dass MMP-10 die Demyelinisierung verstärkt, könnte dies ein Grund für die höheren erreichten Scores der *Trpm7<sup>+/+</sup>* Mäuse bei der passiven EAE sein. Da die *Trpm7<sup>R/R</sup>* weniger *Mmp-10* exprimieren, waren die Schädigung der Myelinscheide geringer und somit auch der Score.

Matrix Metalloproteasen sind im Allgemeinen an der Degradierung der extrazellulären Matrix und Aktivierung von Wachstumsfaktoren beteiligt. Dabei sind sie Teil von physiologischen Abläufen, wie der Angiogenese oder der Wundheilung sowie pathologischer Prozesse, wie Arthritis oder Krebs.

Aufgrund seiner Beteiligung an verschiedenen Erkrankungen scheint MMP-10 ein starkes Tumorigenes Potential zu besitzen und lässt vermuten dass MMP-10 eher an pathologischen Abläufen eine Rolle trägt [199, 200]. Es wird außerdem vermutete, dass MMP-10 eine aktive Rolle in der Störung der BHS hat [198, 201, 202], wie genau MMP-10 Einfluss auf die BHS nimmt, ist jedoch noch unklar. In den Versuchen der passiven EAE zeigte sich dass keine Migration der exogenen T<sub>H</sub>17-Zellen, in das ZNS der nicht erkrankten TRPM7-Kinasedefizienten Mäusen stattfand, in das ZNS der nicht erkrankten *Trpm7<sup>+/+</sup>* Mäusen jedoch

schon. Nimmt man das mit den Ergebnissen der Transkriptomanalyse, in Bezug auf die verringerte *Mmp-10* Expression der *Trpm7<sup>R/R</sup>* T-Zellen ohne IL-1 $\beta$  zusammen, lässt sich vermuten, dass durch die fehlenden TRPM7-Kinaseaktivität, weniger MMP-10 sezerniert wird, das Durchdringen der BHS erschwert und die Migration der T<sub>H</sub>17 verhindert wird.

Zusammen mit dem klinischen Befund des mildereren Krankheitsverlauf der *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tieren bei der passiven EAE, der verminderten Infiltration pro-inflammatorischer T<sub>H</sub>17 Zellen in das ZNS bei nicht erkrankten *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tieren, sowie der vermehrten Migration regulatorischen T-Lymphozyten in das ZNS der erkrankten *Trpm7<sup>R/R</sup>* Tiere, kann davon ausgegangen werden, dass eine Blockade der TRPM7-Kinase ein enormes therapeutisches Potenzial in der Behandlung von multipler Sklerose hat.

#### 6.5. TRPM7-Kinaseaktivität reduziert die Chemokinexpression unter T<sub>H</sub>17 Differenzierungsbedingungen

Chemokine steuern im Allgemeinen das Migrationsverhalten und die Lage verschiedener Immunzellen chemotaktisch [203]. Die Expression der CCLs und dessen Rezeptoren CCR/CXCR agieren direkt oder über einen Gradienten und können entweder pro-entzündlich oder auch homöostatisch wirken [204, 205].

Die Chemokine CCL3, CCL4 und CCL5 werden im Allgemeinen als entzündlich charakterisiert. In Kombination sind sie für die Fähigkeit bekannt, die Rekrutierung von Immunzellen ins ZNS zu steuern, dabei aktivieren sie ihren gemeinsamen Rezeptor CCR5 [206]. Interessanterweise konnten wir bei der Analyse des Transkriptoms feststellen, dass eben diese Chemokine, in der Differenzierungsbedingung *Trpm7<sup>R/R</sup>* ohne IL-1 $\beta$ , hochreguliert werden im Vergleich zu den anderen Differenzierungsbedingungen und den Basalwerten. Das aber steht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus den Versuchen der passiven EAE. Hier zeigte sich, dass die inaktive Kinase zu einem mildereren Krankheitsverlauf führt, also einen anti-entzündlichen Phänotyp zeigt. Die also sonst pro-inflammatorischen Chemokine müssen, unter bestimmten Voraussetzungen zu einem anti-inflammatorischen Phänotyp führen.

Wie empfindlich das Chemokinsystem ist, zeigt die Einzelbetrachtung der Chemokine. Auf der einen Seite wird CCL5 benötigt um eine geeignete Immunantwort gegen Krebszellen auszulösen, auf der anderen Seite jedoch sezernieren die Krebszellen selbst CCL5 um immunsuppressive T<sub>reg</sub> Zellen anzulocken, zu proliferieren und zu metastasieren [207, 208].

Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass von B-Zellen ausgeschüttetes CCL4 ebenfalls die Migration von regulatorischen T-Zellen induziert [209]. In unseren Experimenten konnten wir in der passiven EAE eine vermehrte Migration von T<sub>reg</sub> Zellen ins ZNS der Kinase-defizienten Tiere feststellen.

Auch die Expression von *Cxcr1* und *Ccl9* wird in *Trpm7<sup>R/R</sup>* Zellen, die ohne IL-1 $\beta$  differenziert wurden, hochreguliert. In der Immuntherapie zur Behandlung von Melanomen ist CXCR1 eine mögliche Zielstruktur. Die Expression von CXCR1 auf der Oberfläche von Tumor-Infiltrierenden Lymphozyten (TIL) hat einen positiven Effekt auf die Anzahl der migrierenden TILs hin zum Melanom [210]. CXCR1 hat also ebenfalls das Potential die Effektorzellmigration zu erhöhen. Die Funktion von CCL9 ist jedoch weitestgehend unbekannt [203]. In Kombination mit anderen Chemokinen ist es ebenfalls beteiligt an der Migration pro-entzündlicher Zellen hin zu entzündlichen Regionen [206]. Allerdings gibt es auch bei CCL9 einen Zusammenhang mit der Rekrutierung von T<sub>reg</sub>-Zellen. Über einen Gradienten verschiedenster Chemokine und Rezeptoren sowie dem S1PR1 Rezeptor wird die Infiltration von regulatorischen T-Lymphozyten in Melanome gesteuert [211]. Für S1PR1 ist das Expressionslevel in *Trpm7<sup>R/R</sup>* Zellen ohne IL-1 $\beta$ , verglichen mit den basalen Werten, nicht noch weiter herunterreguliert worden, wie es für die anderen drei Differenzierungsbedingungen der Fall war.

Diese besondere Zusammensetzung der Chemokine und Rezeptoren in *Trpm7<sup>R/R</sup>* Zellen ohne IL-1 $\beta$  Stimulus, lässt vermuten, dass sie ein anti-inflammatorisches Signal auslöst, indem beispielsweise insbesondere regulatorische T-Zellen migrieren. Dieses Signal könnte für den milderen Krankheitsverlauf der *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäuse bei der passiven EAE verantwortlich sein.

Die Kombination der Chemokine könnte also zu einer vermehrten T<sub>reg</sub> Migration, hin zu den entzündlichen Prozessen im ZNS, führen. Dabei würden sie sich immunsuppressiv auf die autoreaktiven T<sub>H</sub>17 Zellen auswirken und damit die Entstehung einer EAE verhindern oder den Krankheitsverlauf stark abmildern. Da der größte Teil der hochregulierten Chemokine und Rezeptoren an pro-entzündlichen Abläufen beteiligt ist, könnte es durch die Kombination mit dem CCL9, dessen Funktion weitgehend unklar ist, zu einem milderen Krankheitsverlauf, trotz Hochregulation der besagten Chemokine kommen. Die Kinasefunktion scheint normalerweise die Expression dieser Chemokine zu minimieren und damit die pro-inflammatorischen Prozesse zu fördern. Durch die Blockade der Kinase wäre es also möglich die Reaktion umzukehren, von autoreaktiv und pro-entzündlich, zu anti-inflammatorisch. Zusätzlich dazu könnten T<sub>reg</sub> Zellen zur Remyelinisierung der Nervenbanden beitragen [212]. Durch die

vermehrte Migration der T<sub>reg</sub> Zellen in das ZNS durch die Kinaseblockade könnte sich also zusätzlich die bereits geschädigte Myelinscheide erholen. Dies würde die TRPM7 Kinase ebenfalls in fortgeschrittener multipler Sklerose zu einer Zielstruktur von großem Interesse machen, und motorische Einschränkungen ließen sich möglicherweise so mildern.

## 7. Ausblick

In Bezug auf die klinische Notwendigkeit neuer Medikamente, bei der Behandlung von Multipler Sklerose ist die TRPM7-Kinase eine mögliche, spannende Zielstruktur. Die Versuche in der passiven EAE zeigen deutlich das anti-inflammatorische Potenzial durch den Block der Kinase. Durch die selektive Suppression des Immunsystems, bringt es zusätzliche Vorteile gegenüber den bisher verwendeten Immunsuppressiva mit, die die gesamte Immunantwort unterdrücken. Dennoch bedarf es weiteren Untersuchungen, um genau zu verstehen, inwiefern die TRPM7-Kinase Einfluss auf die Immunzelle, Rekrutierung, Migration und Differenzierung nimmt. Die Transkriptionsanalyse zeigt deutlich, dass die Kinase die Expression wichtiger Zytokine steuert, die einen Einfluss auf eben diese Prozesse haben. Es bleibt jedoch zu klären ob die Expression auf der RNA-Ebene sich auch auf die Proteinebene niederschlägt, um ein genaues chemotaktisches Profil zu erstellen. Mithilfe von ELISA Experimenten kann festgestellt werden, ob auch die Translation in die Proteine in gleicher Menge stattfindet.

Die erhöhte T<sub>reg</sub> Zellpopulation im ZNS der kranken *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäuse bei der passiven EAE und die einzigartigen Chemokinexpression, die Hinweise auf das Rekrutierungspotential von T<sub>reg</sub> Zellen geben, werfen die Frage auf, inwiefern auf in diesen Zellen die Kinase Einfluss auf diese Signale nimmt. Hierbei soll ebenfalls eine Transkriptionsanalyse Abhilfe schaffen. Untersucht werden, natürlich vorkommende T<sub>reg</sub> Zellen die aus *Trpm7<sup>+/+</sup>* und *Trpm7<sup>R/R</sup>* Mäusen Isoliert werden.

Die Übertragbarkeit von den tierexperimentellen Ansätzen ist nicht immer gegeben und stellt die Wissenschaft vor große Herausforderungen. Um schon während der laufenden Grundlagenforschung mithilfe von Tierversuchen, eine mögliche Übertragung auf den Menschen zu ermöglichen, werden wir parallel, mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln an dieser Hürde arbeiten. Wir konnten in dieser Arbeit bereits zeigen, dass TRPM7 auf Lymphozyten des CSF von MS Patienten funktionell exprimiert ist. Bislang konnten wir aber

nicht feststellen, um welche Art von Lymphozyten es sich handelt. Dazu werden wir nach der Messung des TRPM7-Stroms mittels der Patch-Clamp Technik, die einzelner Zellen entnehmen und eine Einzel-Zell-Sequenzierung durchführen. Diese Technik ermöglicht uns Unterschiede in der Anzahl an exprimierten TRPM7 auf der Oberfläche verschiedener Lymphozytenpopulationen festzustellen. Außerdem werden wir analysieren, ob sich ein spezielles Chemokin und Zytokinprofil im Überstand des Liquors abzeichnet. Diese verglichen mit den Profilen aus der Maus könnten uns Aufschluss über Parallelen und Unterschiede geben.

Der aber wohl wichtigste Punkt ist die Entwicklung eines spezifischen und gut verträglichen Kinaseblockers. Der erst kürzlich als TRPM7-Kinase Inhibitor beschriebene, TG110-115, wurde ursprünglich als PI3K $\gamma$  Inhibitor entwickelt [75, 213]. Zwar ist TG110-1215 als TRPM7-Kinase Blocker sehr potent, ist aber durch die geringe Selektivität, als mögliche pharmakologische Substanz nicht zu verwenden. Mit einem potenten und spezifischen Blocker kann dann der Einfluss der Kinaseinaktivierung während einer sich entwickelnden EAE getestet werden und die Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse evaluiert werden.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Cosens, D. and A. Manning, *Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant*. Nature, 1969. **224**(5216): p. 285-287.
2. Montell, C. and G.M. Rubin, *Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction*. Neuron, 1989. **2**(4): p. 1313-1323.
3. Nilius, B. and G. Owsianik, *The transient receptor potential family of ion channels*. Genome biology, 2011. **12**(3): p. 1-11.
4. Clapham, D.E., *TRP channels as cellular sensors*. Nature, 2003. **426**(6966): p. 517-524.
5. Wu, L.-J., T.-B. Sweet, and D.E. Clapham, *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family*. Pharmacological reviews, 2010. **62**(3): p. 381-404.
6. McKemy, D.D., W.M. Neuhauser, and D. Julius, *Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation*. Nature, 2002. **416**(6876): p. 52-58.
7. Vriens, J. and T. Voets, *Heat sensing involves a TRP triplet of ion channels*. British journal of pharmacology, 2019. **176**(20): p. 3893-3898.
8. Sabnis, A.S., et al., *Human lung epithelial cells express a functional cold-sensing TRPM8 variant*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2008. **39**(4): p. 466-474.
9. Julius, D., *TRP channels and pain*. Annual review of cell and developmental biology, 2013. **29**: p. 355-384.
10. Zhang, Y., et al., *Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways*. Cell, 2003. **112**(3): p. 293-301.
11. Pérez, C.A., et al., *A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells*. Nature neuroscience, 2002. **5**(11): p. 1169-1176.
12. Owsianik, G., et al., *Permeation and selectivity of TRP channels*. Annu. Rev. Physiol., 2006. **68**: p. 685-717.
13. Zhao, S. and T. Rohacs, *The newest TRP channelopathy: Gain of function TRPM3 mutations cause epilepsy and intellectual disability*. Channels, 2021. **15**(1): p. 386-397.
14. Nilius, B. and G. Owsianik, *Transient receptor potential channelopathies*. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2010. **460**(2): p. 437-450.
15. Clapham, D.E., L.W. Runnels, and C. Strübing, *The TRP ion channel family*. Nature Reviews Neuroscience, 2001. **2**(6): p. 387-396.
16. Chubanov, V., et al., *Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(9): p. 2894-2899.
17. Demeuse, P., R. Penner, and A. Fleig, *TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domain*. The Journal of general physiology, 2006. **127**(4): p. 421-434.
18. Dorovkov, M.V. and A.G. Ryazanov, *Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(49): p. 50643-50646.
19. Dorovkov, M.V., A.S. Kostyukova, and A.G. Ryazanov, *Phosphorylation of annexin A1 by TRPM7 kinase: a switch regulating the induction of an  $\alpha$ -helix*. Biochemistry, 2011. **50**(12): p. 2187-2193.

20. 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 letters, 2008. **582**(20): p. 2993-2997.
21. Deason-Towne, F., A.-L. Perraud, and C. Schmitz, *Identification of Ser/Thr phosphorylation sites in the C2-domain of phospholipase C  $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) using TRPM7-kinase*. Cellular signalling, 2012. **24**(11): p. 2070-2075.
22. Gotru, S.K., et al., *TRPM7 kinase controls calcium responses in arterial thrombosis and stroke in mice*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2018. **38**(2): p. 344-352.
23. Romagnani, A., et al., *TRPM7 kinase activity is essential for T cell colonization and alloreactivity in the gut*. Nature communications, 2017. **8**(1): p. 1-14.
24. Chubanov, V., et al., *Natural and synthetic modulators of the TRPM7 channel*. Cells, 2014. **3**(4): p. 1089-1101.
25. 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*. The Journal of general physiology, 2005. **126**(5): p. 499-514.
26. Runnels, L.W., L. Yue, and D.E. Clapham, *The TRPM7 channel is inactivated by PIP2 hydrolysis*. Nature cell biology, 2002. **4**(5): p. 329-336.
27. Yu, H., et al., *TRPM7 is regulated by halides through its kinase domain*. Cellular and molecular life sciences, 2013. **70**(15): p. 2757-2771.
28. Kaitsuka, T., et al., *Inactivation of TRPM7 kinase activity does not impair its channel function in mice*. Scientific reports, 2014. **4**(1): p. 1-7.
29. Nadler, M.J., et al., *LTRPC7 is a Mg $\cdot$  ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 590-595.
30. Li, M., J. Jiang, and L. Yue, *Functional characterization of homo-and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7*. The Journal of general physiology, 2006. **127**(5): p. 525-537.
31. Ryazanova, L.V., et al., *TRPM7 is essential for Mg $^{2+}$  homeostasis in mammals*. Nature communications, 2010. **1**(1): p. 1-9.
32. Jin, J., et al., *Deletion of Trpm7 disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg $^{2+}$  homeostasis*. Science, 2008. **322**(5902): p. 756-760.
33. Ryazanova, L.V., et al., *Elucidating the role of the TRPM7  $\alpha$ -kinase: TRPM7 kinase inactivation leads to magnesium deprivation resistance phenotype in mice*. Scientific reports, 2014. **4**(1): p. 1-11.
34. Ryazanova, L.V., et al., *Characterization of the protein kinase activity of TRPM7/ChaK1, a protein kinase fused to the transient receptor potential ion channel*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(5): p. 3708-3716.
35. 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. 1043-1047.
36. Kim, T.Y., et al., *Identification of the phosphorylation sites on intact TRPM7 channels from mammalian cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2012. **417**(3): p. 1030-1034.
37. Brandao, K., et al., *TRPM6 kinase activity regulates TRPM7 trafficking and inhibits cellular growth under hypomagnesian conditions*. Cellular and molecular life sciences, 2014. **71**(24): p. 4853-4867.
38. Zeng, Z., et al., *TRPM7 regulates vascular endothelial cell adhesion and tube formation*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2015. **308**(4): p. C308-C318.

39. Zierler, S., S. Hampe, and W. Nadolni, *TRPM channels as potential therapeutic targets against pro-inflammatory diseases*. Cell Calcium, 2017. **67**: p. 105-115.
40. Park, H.S., et al., *The pathophysiologic roles of TRPM7 channel*. The Korean Journal of Physiology & Pharmacology, 2014. **18**(1): p. 15-23.
41. Chen, J., et al., *TRPM7 channel inhibition mediates midazolam-induced proliferation loss in human malignant glioma*. Tumor Biology, 2016. **37**(11): p. 14721-14731.
42. Song, C., et al., *Suppression of TRPM7 enhances TRAIL-induced apoptosis in triple-negative breast cancer cells*. Journal of Cellular Physiology, 2020. **235**(12): p. 10037-10050.
43. Hanano, T., et al., *Involvement of TRPM7 in cell growth as a spontaneously activated Ca<sup>2+</sup> entry pathway in human retinoblastoma cells*. Journal of pharmacological sciences, 2004. **95**(4): p. 403-419.
44. Kim, B.J., et al., *Transient receptor potential melastatin 7 channels are involved in ginsenoside Rg3-induced apoptosis in gastric cancer cells*. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 2011. **109**(4): p. 233-239.
45. Guilbert, A., et al., *Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2009. **297**(3): p. C493-C502.
46. Stritt, S., et al., *Defects in TRPM7 channel function deregulate thrombopoiesis through altered cellular Mg<sup>2+</sup> homeostasis and cytoskeletal architecture*. Nature communications, 2016. **7**(1): p. 1-13.
47. Aarts, M., et al., *A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death*. Cell, 2003. **115**(7): p. 863-877.
48. Paravicini, T.M., V. Chubanov, and T. Gudermann, *TRPM7: a unique channel involved in magnesium homeostasis*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2012. **44**(8): p. 1381-1384.
49. Sun, Y., et al., *TRPM7 and its role in neurodegenerative diseases*. Channels, 2015. **9**(5): p. 253-261.
50. Fleig, A. and V. Chubanov, *Andrea Fleig and Vladimir Chubanov*. Handbook of experimental pharmacology, 2014. **222**: p. 521.
51. Macianskiene, R., et al., *Characterization of Mg<sup>2+</sup>-regulated TRPM7-like current in human atrial myocytes*. Journal of Biomedical Science, 2012. **19**(1): p. 1-11.
52. Fleig, A. and V. Chubanov, *Trpm7*. Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels, 2014: p. 521-546.
53. Hiraishi, K., et al., *Potential of the TRPM7 channel as a novel therapeutic target for pulmonary arterial hypertension*. Journal of Smooth Muscle Research, 2022. **58**: p. 50-62.
54. Zierler, S., et al., *Waixenicin A inhibits cell proliferation through magnesium-dependent block of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(45): p. 39328-39335.
55. Kim, B.J., et al., *The role of waixenicin A as transient receptor potential melastatin 7 blocker*. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 2013. **112**(2): p. 83-89.
56. Chokshi, R., P. Fruasaha, and J.A. Kozak, *2-aminoethyl diphenyl borinate (2-APB) inhibits TRPM7 channels through an intracellular acidification mechanism*. Channels, 2012. **6**(5): p. 362-369.
57. DeHaven, W.I., et al., *Complex actions of 2-aminoethyldiphenyl borate on store-operated calcium entry*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(28): p. 19265-19273.



58. Zhang, S.L., et al., *Store-dependent and-independent modes regulating Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel activity of human Orai1 and Orai3*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(25): p. 17662-17671.
59. Hu, H.-Z., et al., *2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(34): p. 35741-35748.
60. Nadolni, W., et al., *TRPM7 kinase is essential for neutrophil recruitment and function via regulation of Akt/mTOR signaling*. Frontiers in immunology, 2021. **11**: p. 606893.
61. Voringer, S., et al., *Inhibition of TRPM7 blocks MRTF/SRF-dependent transcriptional and tumorigenic activity*. Oncogene, 2020. **39**(11): p. 2328-2344.
62. Chubanov, V., et al., *Natural and synthetic modulators of SK (Kca2) potassium channels inhibit magnesium-dependent activity of the kinase-coupled cation channel TRPM7*. British journal of pharmacology, 2012. **166**(4): p. 1357-1376.
63. Siddiqui, T., et al., *Expression and contributions of TRPM7 and KCa2. 3/SK3 channels to the increased migration and invasion of microglia in anti-inflammatory activation states*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e106087.
64. Schilling, T., F. Miralles, and C. Eder, *TRPM7 regulates proliferation and polarisation of macrophages*. Journal of cell science, 2014. **127**(21): p. 4561-4566.
65. Liang, H.Y., et al., *Immunomodulatory functions of TRPM7 and its implications in autoimmune diseases*. Immunology, 2022. **165**(1): p. 3-21.
66. Qin, X., et al., *Sphingosine and FTY720 are potent inhibitors of the transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels*. British journal of pharmacology, 2013. **168**(6): p. 1294-1312.
67. Budde, K., et al., *First human trial of FTY720, a novel immunomodulator, in stable renal transplant patients*. Journal of the American Society of Nephrology, 2002. **13**(4): p. 1073-1083.
68. Brinkmann, V., et al., *Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis*. Nature reviews Drug discovery, 2010. **9**(11): p. 883-897.
69. Kappos, L., et al., *Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis*. New England Journal of Medicine, 2006. **355**(11): p. 1124-1140.
70. Zhang, L., et al., *FTY720 for cancer therapy*. Oncology reports, 2013. **30**(6): p. 2571-2578.
71. Mandala, S., et al., *Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists*. Science, 2002. **296**(5566): p. 346-349.
72. Rössig, A., et al., *Pharmacological agents selectively acting on the channel moieties of TRPM6 and TRPM7*. Cell Calcium, 2022. **106**: p. 102640.
73. Gschwendt, M., et al., *Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor*. Biochemical and biophysical research communications, 1994. **199**(1): p. 93-98.
74. Devkota, A.K., et al., *Investigating the kinetic mechanism of inhibition of elongation factor 2 kinase by NH125: evidence of a common in vitro artifact*. Biochemistry, 2012. **51**(10): p. 2100-2112.
75. Song, C., et al., *Identification of TG100-115 as a new and potent TRPM7 kinase inhibitor, which suppresses breast cancer cell migration and invasion General subjects*. 2017.
76. Scott, J., et al., *PI3K Isoform Immunotherapy for Solid Tumours*, in *PI3K and AKT Isoforms in Immunity*. 2022, Springer. p. 369-392.
77. Prakriya, M. and R.S. Lewis, *Separation and characterization of currents through store-operated CRAC channels and Mg<sup>2+</sup>-inhibited cation (MIC) channels*. The Journal of general physiology, 2002. **119**(5): p. 487-508.

78. Hofmann, T., et al., *Activation of TRPM7 channels by small molecules under physiological conditions*. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2014. **466**(12): p. 2177-2189.
79. Schäfer, S., et al., *Mibefradil represents a new class of benzimidazole TRPM7 channel agonists*. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2016. **468**(4): p. 623-634.
80. Torang, A., P. Gupta, and D.J. Klink, *An elastic-net logistic regression approach to generate classifiers and gene signatures for types of immune cells and T helper cell subsets*. BMC bioinformatics, 2019. **20**(1): p. 1-15.
81. Goodridge, H. and M. Harnett, *Introduction to immune cell signalling*. Parasitology, 2005. **130**(S1): p. S3-S9.
82. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. The Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-1789.
83. Chaigne-Delalande, B. and M.J. Lenardo, *Divalent cation signaling in immune cells*. Trends in immunology, 2014. **35**(7): p. 332-344.
84. Feske, S., H. Wulff, and E.Y. Skolnik, *Ion channels in innate and adaptive immunity*. Annual review of immunology, 2015. **33**: p. 291.
85. Lewis, R.S., *The molecular choreography of a store-operated calcium channel*. Nature, 2007. **446**(7133): p. 284-287.
86. Gupta, S., *Mechanisms of transmembrane signalling in human T cell activation*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1989. **91**(1): p. 45-50.
87. Feske, S., et al., *A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 179-185.
88. Vaeth, M., et al., *ORAI2 modulates store-operated calcium entry and T cell-mediated immunity*. Nature communications, 2017. **8**(1): p. 1-17.
89. Gwack, Y., et al., *Signalling to transcription: store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and NFAT activation in lymphocytes*. Cell calcium, 2007. **42**(2): p. 145-156.
90. Li, F.-Y., et al., *Second messenger role for Mg<sup>2+</sup> revealed by human T-cell immunodeficiency*. Nature, 2011. **475**(7357): p. 471-476.
91. Matsuda-Lennikov, M., et al., *Magnesium transporter 1 (MAGT1) deficiency causes selective defects in N-linked glycosylation and expression of immune-response genes*. Journal of Biological Chemistry, 2019. **294**(37): p. 13638-13656.
92. Watson, C.M., et al., *Identification of a novel MAGT1 mutation supports a diagnosis of XMEN disease*. Genes & Immunity, 2022. **23**(2): p. 66-72.
93. Rink, L. and H. Haase, *Zinc homeostasis and immunity*. Trends in immunology, 2007. **28**(1): p. 1-4.
94. Ryu, M.-S., et al., *Genomic analysis, cytokine expression, and microRNA profiling reveal biomarkers of human dietary zinc depletion and homeostasis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(52): p. 20970-20975.
95. Brazão, V., et al., *Zinc supplementation increases resistance to experimental infection by Trypanosoma cruzi*. Veterinary parasitology, 2008. **154**(1-2): p. 32-37.
96. Nowak, J.E., et al., *Prophylactic zinc supplementation reduces bacterial load and improves survival in a murine model of sepsis*. Pediatric Critical Care Medicine, 2012. **13**(5): p. e323-e329.
97. Hasan, R., L. Rink, and H. Haase, *Zinc signals in neutrophil granulocytes are required for the formation of neutrophil extracellular traps*. Innate immunity, 2013. **19**(3): p. 253-264.

98. Bischoff, S.C., *Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(2): p. 93-104.
99. Bulfone-Paus, S., et al., *Positive and negative signals in mast cell activation*. Trends in immunology, 2017. **38**(9): p. 657-667.
100. Zierler, S., et al., *TRPM7 kinase activity regulates murine mast cell degranulation*. The Journal of physiology, 2016. **594**(11): p. 2957-2970.
101. Gilfillan, A.M. and C. Tkaczyk, *Integrated signalling pathways for mast-cell activation*. Nature Reviews Immunology, 2006. **6**(3): p. 218-230.
102. Faouzi, M., et al., *The TRPM7 channel kinase regulates store-operated calcium entry*. The Journal of physiology, 2017. **595**(10): p. 3165-3180.
103. Bomfim, G.H.S., et al., *TRPM7 activation potentiates SOCE in enamel cells but requires ORAI*. Cell Calcium, 2020. **87**: p. 102187.
104. Huang, L., et al., *Inhibition of TRPM7 channels reduces degranulation and release of cytokines in rat bone marrow-derived mast cells*. International journal of molecular sciences, 2014. **15**(7): p. 11817-11831.
105. Amulic, B., et al., *Neutrophil function: from mechanisms to disease*. Annual review of immunology, 2012. **30**: p. 459-489.
106. Kobayashi, S.D., N. Malachowa, and F.R. DeLeo, *Neutrophils and bacterial immune evasion*. Journal of Innate Immunity, 2018. **10**(5-6): p. 432-441.
107. Immler, R., S.I. Simon, and M. Sperandio, *Calcium signalling and related ion channels in neutrophil recruitment and function*. European journal of clinical investigation, 2018. **48**: p. e12964.
108. Wang, C.-h., et al., *CD147 up-regulates calcium-induced chemotaxis, adhesion ability and invasiveness of human neutrophils via a TRPM-7-mediated mechanism*. Rheumatology, 2014. **53**(12): p. 2288-2296.
109. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Control of adaptive immunity by the innate immune system*. Nature immunology, 2015. **16**(4): p. 343-353.
110. Varol, C., A. Mildner, and S. Jung, *Macrophages: development and tissue specialization*. Annu Rev Immunol, 2015. **33**(1): p. 643-675.
111. Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon, *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective*. Annual review of immunology, 2009. **27**: p. 451-483.
112. Rhee, I., *Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment*. Archives of pharmacal research, 2016. **39**(11): p. 1588-1596.
113. Schappe, M.S., et al., *Chanzyme TRPM7 mediates the Ca<sup>2+</sup> influx essential for lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 endocytosis and macrophage activation*. Immunity, 2018. **48**(1): p. 59-74. e5.
114. Li, Y., et al., *The interaction of transient receptor potential melastatin 7 with macrophages promotes vascular adventitial remodeling in transverse aortic constriction rats*. Hypertension Research, 2014. **37**(1): p. 35-42.
115. Jin, L., et al., *A biodegradable Mg-based alloy inhibited the inflammatory response of THP-1 cell-derived macrophages through the TRPM7–PI3K–AKT1 signaling axis*. Frontiers in immunology, 2019. **10**: p. 2798.
116. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. The Journal of clinical investigation, 2012. **122**(3): p. 787-795.
117. Rios, F.J., et al., *Chanzyme TRPM7 protects against cardiovascular inflammation and fibrosis*. Cardiovascular research, 2020. **116**(3): p. 721-735.

118. Granucci, F., *The family of LPS signal transducers increases: the arrival of chanzymes*. Immunity, 2018. **48**(1): p. 4-6.
119. Li, L., et al., *TRPM7 modulates macrophage polarization by STAT1/STAT6 pathways in RAW264. 7 cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020. **533**(4): p. 692-697.
120. Yatim, K.M. and F.G. Lakkis, *A brief journey through the immune system*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2015. **10**(7): p. 1274-1281.
121. Heinzl, S., et al., *The regulation of lymphocyte activation and proliferation*. Current opinion in immunology, 2018. **51**: p. 32-38.
122. Beesetty, P., et al., *Inactivation of TRPM7 kinase in mice results in enlarged spleens, reduced T-cell proliferation and diminished store-operated calcium entry*. Scientific reports, 2018. **8**(1): p. 1-22.
123. Nadolni, W. and S. Zierler, *The channel-kinase TRPM7 as novel regulator of immune system homeostasis*. Cells, 2018. **7**(8): p. 109.
124. Sahni, J. and A.M. Scharenberg, *TRPM7 ion channels are required for sustained phosphoinositide 3-kinase signaling in lymphocytes*. Cell metabolism, 2008. **8**(1): p. 84-93.
125. Sahni, J., et al., *TRPM7 regulates quiescent/proliferative metabolic transitions in lymphocytes*. Cell cycle, 2010. **9**(17): p. 3565-3574.
126. Krishnamoorthy, M., et al., *The channel-kinase TRPM7 regulates antigen gathering and internalization in B cells*. Science signaling, 2018. **11**(533): p. eaah6692.
127. Krishnamoorthy, M., et al., *The ion channel TRPM7 is required for B cell lymphopoiesis*. Science signaling, 2018. **11**(533): p. eaan2693.
128. Kamada, N. and G. Núñez, *Role of the gut microbiota in the development and function of lymphoid cells*. The Journal of Immunology, 2013. **190**(4): p. 1389-1395.
129. Campbell, D.J. and E.C. Butcher, *Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4+ T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues*. The Journal of experimental medicine, 2002. **195**(1): p. 135-141.
130. Van Wijk, F. and H. Cheroutre, *Mucosal T cells in gut homeostasis and inflammation*. Expert review of clinical immunology, 2010. **6**(4): p. 559-566.
131. Veldhoen, M., et al., *TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-189.
132. Zenewicz, L.A., et al., *Unraveling the genetics of autoimmunity*. Cell, 2010. **140**(6): p. 791-797.
133. Goris, A. and A. Liston, *The immunogenetic architecture of autoimmune disease*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2012. **4**(3): p. a007260.
134. Firestein, G.S., *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 356-361.
135. Scott, D.L. and S. Steer, *The course of established rheumatoid arthritis*. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2007. **21**(5): p. 943-967.
136. Li, X., et al., *Inhibition of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channel induces RA FLSs apoptosis through endoplasmic reticulum (ER) stress*. Clinical rheumatology, 2014. **33**(11): p. 1565-1574.
137. Huang, Y., et al., *TRPM7 channels play a role in high glucose-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal cell apoptosis*. Journal of Biological Chemistry, 2018. **293**(37): p. 14393-14406.
138. Gommers, L.M., et al., *Low extracellular magnesium does not impair glucose-stimulated insulin secretion*. PloS one, 2019. **14**(6): p. e0217925.

139. Khajavi, N., et al., *TRPM7 kinase is required for insulin production and compensatory islet responses during obesity*. JCI insight, 2023. **8**(3).
140. Tada, T., et al., *Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia-and Ia+ helper T cells*. The Journal of experimental medicine, 1978. **147**(2): p. 446-458.
141. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-238.
142. Matusevicius, D., et al., *Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis*. Multiple Sclerosis Journal, 1999. **5**(2): p. 101-104.
143. Ferrara, J.L. and P. Reddy. *Pathophysiology of graft-versus-host disease*. in *Seminars in hematology*. 2006. Elsevier.
144. Kamermans, A., et al., *Reactive astrocytes in multiple sclerosis impair neuronal outgrowth through TRPM7-mediated chondroitin sulfate proteoglycan production*. Glia, 2019. **67**(1): p. 68-77.
145. Lubetzki, C. and B. Stankoff, *Demyelination in multiple sclerosis*. Handbook of clinical neurology, 2014. **122**: p. 89-99.
146. Fletcher, J.M., et al., *T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. Clinical & Experimental Immunology, 2010. **162**(1): p. 1-11.
147. Lassmann, H., *Pathogenic mechanisms associated with different clinical courses of multiple sclerosis*. Frontiers in immunology, 2019. **9**: p. 3116.
148. Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft, B.e.V. *Was ist MS*. [Web Page]; Available from: <https://www.dmsg.de/multiple-sklerose/was-ist-ms>.
149. Carrasco-Campos, M.I., et al., *Pharmacogenetic Predictors of Response to Interferon Beta Therapy in Multiple Sclerosis*. Molecular Neurobiology, 2021. **58**(9): p. 4716-4726.
150. Sferruzza, G., et al., *Transcriptomic analysis of peripheral monocytes upon fingolimod treatment in relapsing remitting multiple sclerosis patients*. Molecular Neurobiology, 2021. **58**(10): p. 4816-4827.
151. Koseoglu, E., et al., *The beneficial clinical effects of teriflunomide in experimental autoimmune myasthenia gravis and the investigation of the possible immunological mechanisms*. Cellular and Molecular Neurobiology, 2022: p. 1-17.
152. Zozulya, A.L. and H. Wiendl, *The role of regulatory T cells in multiple sclerosis*. Nature clinical practice Neurology, 2008. **4**(7): p. 384-398.
153. Lee, G.R., *The balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(3): p. 730.
154. Constantinescu, C.S., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)*. British journal of pharmacology, 2011. **164**(4): p. 1079-1106.
155. Steinman, L. and S.S. Zamvil, *Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis*. Trends in immunology, 2005. **26**(11): p. 565-571.
156. Teitelbaum, D., et al., *Copolymer 1 inhibits chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid protein (PLP) peptides in mice and interferes with PLP-specific T cell responses*. Journal of neuroimmunology, 1996. **64**(2): p. 209-217.
157. Ben-Nun, A., et al., *The autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis is potentially pathogenic: effect of copolymer 1 on MOG-induced disease*. Journal of neurology, 1996. **243**(1): p. S14-S22.

158. Arnason, M., Barry GW, *Immunologic therapy of multiple sclerosis*. Annual review of medicine, 1999. **50**(1): p. 291-302.
159. Stüve, O. and J.L. Bennett, *Pharmacological properties, toxicology and scientific rationale for the use of natalizumab (Tysabri®) in inflammatory diseases*. CNS drug reviews, 2007. **13**(1): p. 79-95.
160. Mannara, F., et al., *Passive experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 with MOG: evidence of involvement of B cells*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52361.
161. Wekerle, H., et al., *Animal models*. Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society, 1994. **36**(S1): p. S47-S53.
162. Kipp, M., et al., *Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond*. Multiple sclerosis and related disorders, 2012. **1**(1): p. 15-28.
163. Stromnes, I.M. and J.M. Goverman, *Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis*. Nature protocols, 2006. **1**(4): p. 1952-1960.
164. Mazia, D., G. Schatten, and W. Sale, *Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy*. The Journal of cell biology, 1975. **66**(1): p. 198-200.
165. Hooke Laboratories, L. *EAE Induction by Active Immunization in C57BL/6 Mice*. 2008-2022; Available from: [https://hookelabs.com/protocols/eaeAI\\_C57BL6.html#Troubleshooting](https://hookelabs.com/protocols/eaeAI_C57BL6.html#Troubleshooting).
166. Reisine, T., *Pertussis toxin in the analysis of receptor mechanisms*. Biochemical pharmacology, 1990. **39**(10): p. 1499-1504.
167. Anwyl, R., *Modulation of vertebrate neuronal calcium channels by transmitters*. Brain research reviews, 1991. **16**(3): p. 265-281.
168. Cassan, C., et al., *Pertussis toxin reduces the number of splenic Foxp3+ regulatory T cells*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(3): p. 1552-1560.
169. Maddur, M.S., et al., *Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies*. The American journal of pathology, 2012. **181**(1): p. 8-18.
170. Mufazalov, I.A., et al., *IL-1 signaling is critical for expansion but not generation of autoreactive GM-CSF+ Th17 cells*. The EMBO journal, 2017. **36**(1): p. 102-115.
171. Hickey, W.F. *Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles*. in *Seminars in immunology*. 1999. Elsevier.
172. Van Langelaar, J., et al., *B and T cells driving multiple sclerosis: identity, mechanisms and potential triggers*. Frontiers in immunology, 2020. **11**: p. 760.
173. Ellwardt, E., et al., *Understanding the role of T cells in CNS homeostasis*. Trends in immunology, 2016. **37**(2): p. 154-165.
174. Nah, S.-Y., H.-J. Park, and E.W. McCleskey, *A trace component of ginseng that inhibits Ca<sup>2+</sup> channels through a pertussis toxin-sensitive G protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(19): p. 8739-8743.
175. Leaney, J.L. and A. Tinker, *The role of members of the pertussis toxin-sensitive family of G proteins in coupling receptors to the activation of the G protein-gated inwardly rectifying potassium channel*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(10): p. 5651-5656.
176. Mann, M.K., et al., *Pathogenic and regulatory roles for B cells in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Autoimmunity, 2012. **45**(5): p. 388-399.
177. Fillatreau, S., et al., *B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10*. Nature immunology, 2002. **3**(10): p. 944-950.

178. Malard, F., et al., *Translational opportunities for targeting the Th17 axis in acute graft-vs.-host disease*. Mucosal Immunology, 2016. **9**(2): p. 299-308.
179. Ronchi, F., et al., *Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-16 production by myeloid cells*. Nature communications, 2016. **7**(1): p. 1-11.
180. Dinarello, C.A., A. Simon, and J.W. Van Der Meer, *Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases*. Nature reviews Drug discovery, 2012. **11**(8): p. 633-652.
181. Mertens, M. and J.A. Singh, *Anakinra for rheumatoid arthritis*. Cochrane database of systematic reviews, 2009(1).
182. Koné-Paut, I. and C. Galeotti, *Anakinra for cryopyrin-associated periodic syndrome*. Expert review of clinical immunology, 2014. **10**(1): p. 7-18.
183. Hedrich, C., et al., *Anakinra: a safe and effective first-line treatment in systemic onset juvenile idiopathic arthritis (SoJIA)*. Rheumatology international, 2012. **32**(11): p. 3525-3530.
184. Lachmann, H.J., et al., *Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome*. New England Journal of Medicine, 2009. **360**(23): p. 2416-2425.
185. Mueller, S.M., P. Itin, and P. Haeusermann, *Muckle-wells syndrome effectively treated with canakinumab: is the recommended dosing schedule mandatory?* Dermatology, 2011. **223**(2): p. 113-118.
186. Ferrari, C.C., et al., *Reversible demyelination, blood-brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic IL-1 expression in the brain*. The American journal of pathology, 2004. **165**(5): p. 1827-1837.
187. Jana, M. and K. Pahan, *Redox regulation of cytokine-mediated inhibition of myelin gene expression in human primary oligodendrocytes*. Free Radical Biology and Medicine, 2005. **39**(6): p. 823-831.
188. Ziaei, A., et al., *Ermin deficiency leads to compromised myelin, inflammatory milieu, and susceptibility to demyelinating insult*. Brain Pathology, 2022: p. e13064.
189. Kunnath-Velayudhan, S., et al., *Transcriptome analysis of mycobacteria-specific CD4+ T cells identified by activation-induced expression of CD154*. The Journal of Immunology, 2017. **199**(7): p. 2596-2606.
190. Salek Esfahani, B., et al., *Down-regulation of ERMN expression in relapsing remitting multiple sclerosis*. Metabolic Brain Disease, 2019. **34**(5): p. 1261-1266.
191. Musella, A., et al., *'Prototypical' proinflammatory cytokine (IL-1) in multiple sclerosis: role in pathogenesis and therapeutic targeting*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2020. **24**(1): p. 37-46.
192. Antin, J.H., et al., *Interleukin-1 blockade does not prevent acute graft-versus-host disease: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interleukin-1 receptor antagonist in allogeneic bone marrow transplantation*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2002. **100**(10): p. 3479-3482.
193. Baecher-Allan, C. and D.A. Hafler, *Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease*. Immunological reviews, 2006. **212**(1): p. 203-216.
194. Garriss, C.S., et al., *Sphingosine-1-phosphate receptor 1 signalling in T cells: trafficking and beyond*. Immunology, 2014. **142**(3): p. 347-353.
195. Rivera, J., R.L. Proia, and A. Olivera, *The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity*. Nature Reviews Immunology, 2008. **8**(10): p. 753-763.
196. Murphy, K. and C. Weaver, *Die T-Zell-vermittelte Immunität*, in Janeway Immunologie. 2018, Springer. p. 443-515.

197. Gverić, D., et al., *Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors*. Brain, 2003. **126**(7): p. 1590-1598.
198. Lakhan, S.E., et al., *Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke*. Frontiers in neurology, 2013. **4**: p. 32.
199. Regala, R.P., et al., *Matrix metalloproteinase-10 promotes Kras-mediated bronchio-alveolar stem cell expansion and lung cancer formation*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26439.
200. Mariya, T., et al., *Matrix metalloproteinase-10 regulates stemness of ovarian cancer stem-like cells by activation of canonical Wnt signaling and can be a target of chemotherapy-resistant ovarian cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(18): p. 26806.
201. Cuadrado, E., et al., *Vascular MMP-9/TIMP-2 and neuronal MMP-10 up-regulation in human brain after stroke: a combined laser microdissection and protein array study*. Journal of proteome research, 2009. **8**(6): p. 3191-3197.
202. Hillmer, L., et al., *Blood-brain barrier disruption measured by albumin index correlates with inflammatory fluid biomarkers*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2022: p. 0271678X221146127.
203. Griffith, J.W., C.L. Sokol, and A.D. Luster, *Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity*. Annu rev immunol, 2014. **32**(1): p. 659-702.
204. Alvarez Rivas, C., et al., *Differential expression of CC chemokines (CCLs) and receptors (CCRs) by human T lymphocytes in response to different Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotypes*. 2015.
205. Palomino, D.C.T. and L.C. Marti, *Chemokines and immunity*. Einstein (são paulo), 2015. **13**: p. 469-473.
206. Cui, L.-Y., S.-F. Chu, and N.-H. Chen, *The role of chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis*. International immunopharmacology, 2020. **83**: p. 106314.
207. Aldinucci, D. and A. Colombatti, *The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression*. Mediators of inflammation, 2014. **2014**.
208. Kershaw, M.H., J.A. Westwood, and P.K. Darcy, *Gene-engineered T cells for cancer therapy*. Nature Reviews Cancer, 2013. **13**(8): p. 525-541.
209. Bystry, R.S., et al., *B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4*. Nature immunology, 2001. **2**(12): p. 1126-1132.
210. Sapoznik, S., et al., *CXCR1 as a novel target for directing reactive T cells toward melanoma: implications for adoptive cell transfer immunotherapy*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2012. **61**(10): p. 1833-1847.
211. Huang, L., et al., *Targeting regulatory T cells for immunotherapy in melanoma*. Molecular biomedicine, 2021. **2**(1): p. 1-15.
212. McIntyre, L.L., et al., *Regulatory T cells promote remyelination in the murine experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis following human neural stem cell transplant*. Neurobiology of disease, 2020. **140**: p. 104868.
213. Chubanov, V., S. Ferioli, and T. Gudermann, *Assessment of TRPM7 functions by drug-like small molecules*. Cell calcium, 2017. **67**: p. 166-173.



## I. Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanäle von Säugetieren. ....                                                                                                                                                                 | 4  |
| Abbildung 2: Topologie der TRPM7-Kanalkinase.....                                                                                                                                                                                            | 6  |
| Abbildung 3: Stammbaum der Zellen des Immunsystems. ....                                                                                                                                                                                     | 12 |
| Abbildung 4: Isolation von Lymphozyten mittels Dichtezentrifugation. ....                                                                                                                                                                    | 46 |
| Abbildung 5: Basaler Status der zellulären Beschaffenheit des ZNS und der Milz von $Trpm7^{+/+}$ und $Trpm7^{R/R}$ Mäusen.....                                                                                                               | 58 |
| Abbildung 6: Überprüfung des Einflusses des Pertussis Toxin auf die TRPM7-Kanalfunktion. ....                                                                                                                                                | 59 |
| Abbildung 7: Aktive EAE in $Trpm7^{+/+}$ und $Trpm7^{R/R}$ Mäusen. ....                                                                                                                                                                      | 60 |
| Abbildung 8: Vermehrt B-Zellen im ZNS der $Trpm7^{R/R}$ im Vergleich zu $Trpm7^{+/+}$ Mäusen, während aktiver EAE. ....                                                                                                                      | 62 |
| Abbildung 9: Milderer Verlauf der passiven EAE in $Trpm7^{R/R}$ Mäusen, verglichen mit $Trpm7^{+/+}$ Mäusen. ....                                                                                                                            | 65 |
| Abbildung 10: Erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen im ZNS der symptomatischen $Trpm7^{R/R}$ bei der passiven EAE.....                                                                                                                  | 67 |
| Abbildung 11: Keine Unterschiede von FOXP3 <sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen im ZNS, zwischen der nicht symptomatischen $Trpm7^{+/+}$ und $Trpm7^{R/R}$ bei der passiven EAE. ....                                                          | 68 |
| Abbildung 12: Verminderte Migration exogener $V\alpha 3.2^{+}$ T <sub>H</sub> 17 Zellen ins ZNS nicht erkrankten $Trpm7^{R/R}$ Tiere.....                                                                                                    | 69 |
| Abbildung 13: $Trpm7^{R/R}$ Zellen benötigen IL-1 $\beta$ zur Differenzierung in T <sub>H</sub> 17 Zellen.....                                                                                                                               | 71 |
| Abbildung 14: Cluster Analyse zur Überprüfung der Gruppen nach Differenzierungsbedingung. ....                                                                                                                                               | 72 |
| Abbildung 15: Verändertes Transkriptom der $Trpm7^{R/R}$ T <sub>H</sub> 17 Zellen differenziert ohne IL-1 $\beta$ , im Vergleich mit den anderen Differenzierungsbedingungen.....                                                            | 75 |
| Abbildung 16: Veränderungen im Transkriptom der T <sub>H</sub> 17 Zellen, aus $Trpm7^{+/+}$ sowie $Trpm7^{R/R}$ , differenziert je mit und ohne IL-1 $\beta$ , im Vergleich zu ihren undifferenzierten basalen CD4 <sup>+</sup> Zellen. .... | 77 |
| Abbildung 17: TRPM7 exprimiert auf Lymphozyten, isoliert aus dem Liquor von Patienten mit akuter MS. ....                                                                                                                                    | 79 |

## II. Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabelle 1:</b> TRPM7 Modulatoren .....                                                                            | 11 |
| <b>Tabelle 2:</b> Auflistung aller für die Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....                        | 27 |
| <b>Tabelle 3:</b> Verwendete Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung .....                                     | 30 |
| <b>Tabelle 4:</b> Verwendete Kits .....                                                                              | 31 |
| <b>Tabelle 5:</b> Verwendetest Medium und entsprechenden Supplements .....                                           | 32 |
| <b>Tabelle 6:</b> Verwendete Zytokine, mit entsprechender relevanter Zusatzinformation.....                          | 32 |
| <b>Tabelle 7:</b> Primerpaar zur Genotypen-Bestimmung der Mäuse .....                                                | 33 |
| <b>Tabelle 8:</b> Isotypen-Kontrolle für die Verwendeten Antikörper .....                                            | 33 |
| <b>Tabelle 9:</b> Alle Verwendeten Antikörper mit essentiellen Angaben .....                                         | 33 |
| <b>Tabelle 10:</b> Liste aller benötigter Gerätschaften.....                                                         | 36 |
| <b>Tabelle 11:</b> Aufzählung der verwendeten Verbrauchsmittel .....                                                 | 37 |
| <b>Tabelle 12:</b> Verwendete Software.....                                                                          | 40 |
| <b>Tabelle 13:</b> Pipettierschema zur DNS Isolation aus Mäusegewebe .....                                           | 42 |
| <b>Tabelle 14:</b> Pipettierschema zur Anfertigung eines Reaktionsansatzes.....                                      | 42 |
| <b>Tabelle 15:</b> PCR Programm.....                                                                                 | 43 |
| <b>Tabelle 16:</b> Reaktionsansatz für eine Probe zum enzymatischen Verdau.....                                      | 44 |
| <b>Tabelle 17:</b> Kategorisierung und Definition der Belastungsgrade der Tiere im EAE Versuch<br>(Kategorie 1)..... | 47 |
| <b>Tabelle 18:</b> Einteilung des Allgemeinzustandes der Tiere (Kategorie 2) .....                                   | 48 |
| <b>Tabelle 19:</b> Zellzahl mit zugehörigem Verhältnis zum Stimulus für 6- oder 12 Well Titerplatten<br>.....        | 52 |

### III. Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung               | Beschreibung                                         |
|-------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Akt</b>              | Proteinkinase B                                      |
| <b>ALS</b>              | Amyothrome Lateralsklerose                           |
| <b>APC</b>              | Antigen Präsentierende Zelle                         |
| <b>BCR</b>              | B-Zell Rezeptor                                      |
| <b>bp</b>               | Basenpaare                                           |
| <b>BSA</b>              | Bovine Serum Albumin                                 |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>  | Kalzium                                              |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b> | Kalziumchloride                                      |
| <b>Ccl3</b>             | C-C Motiv Chemokin Ligand 3                          |
| <b>Ccl4</b>             | C-C Motiv Chemokin Ligand 4                          |
| <b>Ccl5</b>             | C-C Motiv Chemokin Ligand 5                          |
| <b>Ccl9</b>             | C-C Motiv Chemokin Ligand 9                          |
| <b>CFA</b>              | Complete freud's adjuvant                            |
| <b>Cl<sup>-</sup></b>   | Chlorid                                              |
| <b>CRAC</b>             | „Calcium release activated channel“                  |
| <b>CXCL1</b>            | Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand 1                      |
| <b>CXCL8</b>            | Interleukin-8 oder CXC-Motiv Chemokin 8              |
| <b>Cxcr1</b>            | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1                         |
| <b>DAG</b>              | Diacyl Glycerol                                      |
| <b>DMSO</b>             | Dimethyl sulfoxid                                    |
| <b>DNA</b>              | Deoxyribonucleic acid                                |
| <b>DPBS</b>             | Dulbecco's phosphate buffer saline                   |
| <b>DT-40</b>            | B-Zellelinie aus Hühnern                             |
| <b>EDTA</b>             | Ethylenediaminetetraessigsäure                       |
| <b>EGTA</b>             | Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-<br>tetraessigsäure |
| <b>Ermn</b>             | Ermin                                                |
| <b>FBS</b>              | Fetal bovine Serum                                   |
| <b>G0</b>               | Zellzyklusarrest Phase                               |
| <b>h</b>                | Stunde                                               |

|                         |                                                   |
|-------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>HAP1</b>             | Haploid chronische myeloid Leukemie Zelllinie     |
| <b>HCl</b>              | Salzsäure                                         |
| <b>HEPES</b>            | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure   |
| <b>IL-13</b>            | Interleukin-13                                    |
| <b>IL-2</b>             | Interleukin-2                                     |
| <b>iNOS</b>             | Induzierbare Stickstoffmonooxid Synthase          |
| <b>IP3</b>              | Inositol 1,4,5-Triphosphat                        |
| <b>K<sup>2+</sup></b>   | Kalium                                            |
| <b>KI</b>               | Knock In                                          |
| <b>KO</b>               | Knock out                                         |
| <b>KOH</b>              | Kaliumhydroxid                                    |
| <b>LPS</b>              | Lipopolysaccharide                                |
| <b>M-CSF</b>            | Monozytenkolonien-stimulierender Faktor           |
| <b>MACS Puffer</b>      | „Magnetic cell separation“ Puffer                 |
| <b>MagT1</b>            | Magnesium Transporter 1                           |
| <b>Mg<sup>2+</sup></b>  | Magnesium                                         |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b> | Magnesium Chloride                                |
| <b>min.</b>             | Minute                                            |
| <b>MOG</b>              | Myelin Oligodentrozyten Glykoprotein              |
| <b>ms</b>               | Millisekunde                                      |
| <b>mTOR</b>             | Engl. mechanistic Target of Rapamycin             |
| <b>mV</b>               | Millivolt (Spannung)                              |
| <b>NaCl<sub>2</sub></b> | Natriumchlorid                                    |
| <b>NFAT</b>             | Nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen             |
| <b>ORAI</b>             | Engl. Calcium Release-Activated Calcium Modulator |
| <b>P27kip</b>           | Cyklin-abhängiger Kinaseinhibitor 1B              |
| <b>pA</b>               | Picoamper (Stromstärke)                           |
| <b>pA/pF</b>            | Stromdichte                                       |
| <b>PAM</b>              | Prozentsatz angenommener Punktmutationen          |
| <b>PDL</b>              | Poly-D-Lysin                                      |
| <b>pF</b>               | Picofarad (Kapazität)                             |

|                         |                                                                      |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>PIP2</b>             | Phosphatidylionositol-4,5-biphosphat                                 |
| <b>PKC</b>              | Protein Kinase C                                                     |
| <b>PLC<sub>γ</sub>1</b> | Phospholipase C γ 1                                                  |
| <b>PLC<sub>γ</sub>2</b> | Phosphoinositid-Phospholipase C-gamma                                |
| <b>PM</b>               | Porenmutante                                                         |
| <b>PPMS</b>             | Primär Progrediente Multiple Sklerose                                |
| <b>PTx</b>              | Pertussis Toxin                                                      |
| <b>RNA</b>              | Ribonukleinsäure                                                     |
| <b>RPMI Medium</b>      | „Roswell Park Memorial Institut“ Medium                              |
| <b>RRMS</b>             | Schubförmig remittierende Multiple Sklerose                          |
| <b>RT</b>               | Raumtemperatur                                                       |
| <b>s</b>                | Sekunden                                                             |
| <b>S-Phase</b>          | Replikationsphase de Zellzyklus                                      |
| <b>S1pr1</b>            | Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor 1                                     |
| <b>SEM</b>              | Standardabweichung des Mittelwerts                                   |
| <b>SERCA</b>            | Kalziumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums |
| <b>SOCE</b>             | „store-operated calsium entry“                                       |
| <b>SPMS</b>             | Sekundär Progrediente Multiple Sklerose                              |
| <b>STAT1</b>            | Engl. Signal transducer and activator of transcription-1             |
| <b>STAT6</b>            | Engl. Signal transducer and activator of transcription-6             |
| <b>STIM1</b>            | Stromales Interaktionsmolekül 1                                      |
| <b>Syk</b>              | Spleen associated Tyrosine Kinase                                    |
| <b>TCR</b>              | T-Zell Rezeptor                                                      |
| <b>TGF β</b>            | Transforming Growth factor beta                                      |
| <b>TH17</b>             | T-Helfer Zellen 17                                                   |
| <b>TNFα</b>             | Tumornekrosefaktor-alpha                                             |
| <b>Treg</b>             | Regulartorische T-Lymphozyten                                        |
| <b>TVA</b>              | Tiervesuchsantrag                                                    |
| <b>V</b>                | Volt                                                                 |
| <b>Zn<sup>2+</sup></b>  | Zink                                                                 |

## IV. Versicherung an Eides statt



### Eidesstattliche Versicherung

Jacob, Katharina

Name, Vorname

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

Die Rolle der TRPM7-Kinase im Mausmodell der Multiplen Sklerose

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.

München, 07.11.23

Ort, Datum

Katharina Jacob

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

## V. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann bedanken, dass ich die Möglichkeit erhalten habe, meine Dissertation am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München anzufertigen.

Ein großes Dankeschön geht an meine Doktormutter und Betreuerin Prof. Dr. Susanna Zierler. Vielen Dank das du mir die Möglichkeit gegeben hast, unter deiner Anleitung diese Arbeit zu fertigen. Ich durfte viel neues Lernen und an spannenden Projekten mitarbeiten. Und auch in schwierigen und stressigen Zeiten, hattest du immer ein offenes Ohr und einen guten Rat für mich. Ich habe großen Respekt vor deiner Leistung als Professorin, Forscherin, Arbeitsgruppenleitung und Mutter in einer Person.

Ohne meine Kooperationspartner wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Deshalb möchte ich mich besonders bei Dr. Anna Thomann und Dr. Anneli Peters vom Institut für Klinische Neuroimmunologie, der LMU München bedanken. Eure Expertise in der Durchführung der Experimente war das Fundament der Arbeit und ohne euch und eure Tatkräftige Mitwirkung wäre ich nicht hier. Danke Anna das du mir mit viel Geduld gezeigt hast wie ich die Versuche richtig durchführe. Danke für die Besonnenheit und Ruhe, wenn die Zellen einfach nicht mehr wollen und für deine Gesellschaft beim Warten während den langen Inkubationszeiten.

Wiebke, Kilian, Lynda, Marco, Lisa und Max danke für die schöne, lustige und auch anstrengende Zeit. Wiebke danke für deine Hilfe bei allen Belangen in meiner Anfangszeit, danke für Bambis Gesellschaft, danke für all die witzigen Geschichten, die Unterhaltungen und deiner Expertise. Kilian vielen Dank dafür, dass du der Weise „alte“ Mann im Körper eines jungen bist und immer einen guten Rat hattest. Lisa und Lynda für eure Unterstützung in allen alltäglichen Laborarbeiten. Marco und Max danke das ihr in der Endphase immer die Stellung gehalten habt und den Betrieb am Laufen haltet.

Auch an meine Linzer Kollegen einen kleinen Gruß. Danke Birgit für deine Verbesserungsvorschläge, Korrekturen und Tipps.

Ich möchte auch meinen Dank an die Tierhaltung richten ohne euch wären wir aufgeschmissen. Danke Clarinda das du immer zur Stelle bist und dich so toll um unsere Tiere kümmerst.

Frau Schreier, Frau Kuno, Frau Lakatos und Doris was wäre das Institut nur ohne Sie alle. Danke für ihren unermüdlichen Einsatz und ihre Unterstützung.

Renate und Ingrid auch euch möchte ich danke, es hat mir immer Freude bereitet mit euch zusammenzuarbeiten und danke für die unkomplizierte gegenseitige Unterstützung, dass hat vieles so viel leichter gemacht.

Kati meine Seelentröster und Selfcare Kollegin, die einfach jeder braucht. Danke für die doch viel zu seltenen spontane Gespräche, das unfassbar leckere Koreanische Essen und den Pausenkaffee zwischendurch.

Und Last but not least einen großen Dank an meine Familie und Partner, die sich jedes Leid angehört haben, mich in stressigen Zeiten ausgehalten und unterstützt haben und immer ein offenes Ohr hatten. Ich wäre nicht hier Wenn ich euch nicht hätte.

„Ich habe gelernt, dass der Weg des Fortschritts weder kurz noch unbeschwerlich ist.“  
— Marie Curie