

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Immunologie und Hygiene der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Krönke

Einfluss der Timothy-2-Mutation des L-Typ Calciumkanals Ca_v1.2 auf das Immunsystem von Mäusen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Kai Klaus Sporkmann
aus Oberhausen

promoviert am 1. Dezember 2017

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind von mir selbst ausgeführt worden – teilweise nach entsprechender Anleitung durch Herr Prof. Dr. Olaf Utermöhlen oder andere Mitglieder der Arbeitsgruppe Utermöhlen.

Zucht und Genotypisierung der eingesetzten Mäuse wurden von den MTA der Arbeitsgruppe Utermöhlen Sandra Schramm und Ulrike Karow übernommen.

Zur Beschreibung von Material und Methoden dieser Arbeit konnte ich auf die gemeinschaftliche Anleitungssammlung der Arbeitsgruppe Utermöhlen zurückgreifen.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Martin Krönke für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universitätsklinik Köln unter seiner Leitung anzufertigen.

Besonderer Dank richtet sich an Prof. Dr. Olaf Utermöhlen für die nahe und kontinuierliche Betreuung über die vielen Monate dieser Doktorarbeit, das wertvolle, intensive und freundschaftliche Feedback und die unvergleichliche Bereicherung im Rahmen der Korrektur dieser Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Stefan Herzig für die Initiierung dieses Projekts und die kritische Begleitung desselben sowie speziell auch für viele augenöffnenden Gespräche im Rahmen des Mentorenprogramms der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln.

Ich danke Sandra Schramm und Ulrike Karow für ihre große Unterstützung durch Übernahme der Mausezucht und Genotypisierung.

Sehr dankbar bin ich der gesamten Arbeitsgruppe Utermöhlen für die warmherzige Aufnahme in ihre Mitte und die vielen tollen Stunden im Labor: Kristin, Beate, Sandra, Ulrike, Michael, Marc, Alex, Franzi, Arlette, Betty, Olaf ihr seid super! Es war so toll, zu euch zu gehören!

Ich möchte meiner ganzen Familie dafür danken, dass es sie gibt: Meinen Eltern, die mir immer alles ermöglicht haben, meiner Schwester, bei der ich mich leicht fühle, meiner Oma, die immer da gewesen ist. Danke!

Vielen Dank den tollen Menschen aus Köln, die ich während meines Studiums dort habe kennenlernen dürfen: Meiner WG, die mir eine zweite Familie geworden ist, der Nightline, in der ich meine Seelenverwandten fand, all den Freunden, die mich zu dem gemacht haben, was ich bin.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
1 Abkürzungsverzeichnis	7
2 Einleitung	9
2.1 Der spannungsabhängige Calciumkanal Cav1.2 und seine Rolle im Immunsystem	9
2.2 Die Überaktivierung des Cav1.2 im Rahmen des Timothy-Syndroms und ein korrespondierendes Mausmodell	10
2.3 Die gezielte Steigerung der Expression von Cav1.2mut in TS2 ^{het} -neo-Mäusen durch das Cre/loxP-Systems	11
2.4 Modulation von L-Typ Calciumkanälen durch Behandlung mit Nifedipin und Bay K8644 ...	12
2.5 Modelle zur Untersuchung des Einflusses des Cav1.2 auf das Immunsystem	12
2.5.1 Die akute Infektion der Maus mit dem LCM-Virus	12
2.5.2 Die akute Infektion der Maus mit <i>L. monocytogenes</i>	13
2.5.3 Das Mausmodell der Ovalbuminallergie	13
2.6 Ziel dieser Arbeit	14
3 Material und Methoden	15
3.1 Material	15
3.1.1 Chemikalien, Medien, Lösungen	15
3.1.2 Antikörper	17
3.1.3 Geräte	17
3.1.4 Verbrauchsmaterialien	18
3.1.5 Datenverarbeitungsprogramme	19
3.1.6 Mausezucht	20
3.2 Methoden	21
3.2.1 Datenevaluation	21
3.2.2 Zelllinien, Zellkultur und Zellzählung	21
3.2.3 Infektion der Mäuse mit dem LCMV	22
3.2.4 Umgang mit <i>Listeria monocytogenes</i>	22
3.2.5 Sensibilisierung von Mäusen gegen Ovalbumin	23
3.2.6 Gewinnung von Serumproben aus Mäusen	23
3.2.7 Entnahme von Leber, Milz und Milzzellsuspensionen	23
3.2.8 Gewinnung von Peritonealzellen	24
3.2.9 Bronchoalveoläre Lavage an Mäusen	24
3.2.10 Bakterienlast in Leber und Milz	24
3.2.11 Immunmagnetische Anreicherung von Zellsuspensionen	25
3.2.12 Durchflusszytometrie	25

3.2.13	Virustitration	26
3.2.14	⁵¹ Chrom-Freizetzungstest.....	27
3.2.15	ROS-Messung.....	29
3.2.16	Serologie.....	31
4	Ergebnisse.....	32
4.1	Einfluss des Ca _v 1.2 auf die Immunantwort gegen das LCMV.....	32
4.1.1	Viruslast und Elimination des LCMV in TS2 ^{het} -neo-Mäusen	32
4.1.2	Die LCMV-spezifische zytotoxische Aktivität von CD8 ⁺ T-Zellen in TS2 ^{het} -neo-Mäusen....	34
4.1.3	LCMV-induzierte Expansion von T-Lymphozyten in TS2 ^{het} -neo-Mäusen	37
4.1.4	LCMV-spezifische Antikörper in TS2 ^{het} -neo-Mäusen.....	39
4.1.5	Einfluss von Nifedipin und Bay K8644 als Modulatoren an L-Typ Calciumkanälen auf die LCMV-spezifische zytotoxische Aktivität von CD8 ⁺ T-Zellen aus WT und TS2 ^{het} -neo-Mäusen	41
4.2	Einfluss desCa _v 1.2 auf den Verlauf der Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	45
4.2.1	Überleben von TS2 ^{het} -neo-MxCre- und TS2 ^{het} -neo-LysMCre- Mäusen nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	45
4.2.2	Kontrolle der Bakterienlast von <i>L. monocytogenes</i> in TS2 ^{het} -neo-Mäusen.....	47
4.2.3	Rekrutierung myeloider Zellen in die Peritonealhöhle von TS2 ^{het} -neo-Mäusen nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	48
4.3	Einfluss von Ca _v 1.2 auf die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in CD11b ⁺ myeloiden Zellen	50
4.3.1	Einfluss der TS2-Mutation auf die Basalproduktion von ROS durch CD11b ⁺ Zellen.....	50
4.3.2	Einfluss von Nifedipin und Bay K8644 auf die Produktion von ROS durch myeloide CD11b ⁺ Zellen	52
4.4	Effekt des Ca _v 1.2mut-Transgens in einem murinen Allergiemodell	55
5	Diskussion	58
5.1	Mäuse mit der Timothy-2-Mutation zur Untersuchung der Funktion des Ca _v 1.2 im Immunsystem	58
5.2	Ca _v 1.2 im erworbenen Immunsystem.....	61
5.3	Ca _v 1.2 im angeborenen Immunsystem	63
5.4	Ca _v 1.2 bei Typ-I-Allergien	64
5.5	Ausblick auf die Rolle des Ca _v 1.2 im Immunsystem.....	65
6	Zusammenfassung	67
7	Literaturverzeichnis	68
8	Lebenslauf.....	71

1 Abkürzungsverzeichnis

BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Cav1.2mut	Version des Cav1.2 mit der kanalaktivierenden TS2-Mutation
CD	Cluster of Differentiation
CD4Cre	Expression der Cre-Rekombinase unter dem CD4-Promotor
CFU	Kolonie-bildende Einheit (colony forming unit)
CPM	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E/T-Ratio	Verhältnis zwischen Effektorzellen und Targetzellen
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HKLM	hitze-inaktivierte (heat killed) <i>Listeria monocytogenes</i>
I.E.	Infektiöse Einheit
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LCMV	Lymphozytäre Choriomeningitis Virus
LD 50	(Letale) Dosis, bei der 50% der Mäuse sterben
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LysMCre	Expression der Cre-Rekombinase unter dem LysM-Promotor
MOI	Multiplizität der Infektion
Mx1Cre	Expression der Cre-Rekombinase unter dem Mx1-Promotor
PFU	Plaque-bildende Einheit (plaque forming unit)

RFU	Relative Fluoreszenzeinheit
RLU	Relative Lumineszenzeinheit
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
SPF	von spezifischen Pathogenen frei
SV40	Simian Virus 40
T _{H2} -Zellen	Typ-2-T-Helferzellen
TS2	Timothy-Syndrom 2
TS2 ^{het} -neo-Mäuse	Mäuse mit durch eine invertierte Neomycin-Resistenz-Kassette reduzierter Expression des Cav1.2mut
TS2 ^{het} -neo-CD4Cre-Mäuse	Mäuse, bei denen in T-Zellen die Expression des Cav1.2mut gegenüber TS2 ^{het} -neo-Mäusen potentiell erhöht ist.
TS2 ^{het} -neo-LysMCre-Mäuse	Mäuse, bei denen in Makrophagen und Granulozyten die Expression des Cav1.2mut gegenüber TS2 ^{het} -neo-Mäusen potentiell erhöht ist.
TS2 ^{het} -neo-Mx1Cre-Mäuse	Mäuse, bei denen die Expression des Cav1.2mut nach Stimulation durch Interferon gegenüber TS2 ^{het} -neo-Mäusen potentiell erhöht ist.
WT	Wildtyp

2 Einleitung

2.1 Der spannungsabhängige Calciumkanal $\text{Ca}_v1.2$ und seine Rolle im Immunsystem

Spannungsabhängige Calciumkanäle werden nach ihrer Öffnungswahrscheinlichkeit und ihrer Lokalisation im Körper in unterschiedliche Gruppen unterteilt. L-Typ Calciumkanäle besitzen dabei eine besonders lange Öffnungszeit [48]. Der spannungsabhängige Calciumkanal vom L-Typ $\text{Ca}_v1.2$ kommt in vielen Geweben des Körpers vor. Er wird besonders hoch in Herz und Hirn exprimiert, aber auch in immunologischen Organen wie Lymphknoten, Milz und Thymus ist er detektierbar [41]. In den beiden ersteren Geweben ist die Funktion des Kanals im Rahmen der Reizleitung gut untersucht. Wenig bekannt hingegen ist über die Rolle von $\text{Ca}_v1.2$ im Immunsystem.

Seit 1984 gibt es Hinweise darauf, dass die Blockade spannungsabhängiger Calciumkanäle in T-Zellen einen negativen Effekt auf deren Aktivierung und Proliferation sowie auf ihre Produktion von Interleukin 2 hat [5, 18]. In den letzten Jahren veröffentlichte Berichte deuten vielschichtige Effekte des Kanals im Immunsystem an. Diese reichen von Auswirkungen einer Inaktivierung von $\text{Ca}_v1.2$ in einem murinen Asthmodell [9], über die Makrophagenmigration in Mäusen [13] bis zur Kontrolle von *Mycobacterium tuberculosis* durch Makrophagen und dendritische Zellen *in vitro* [21]. Die Vielschichtigkeit dieser Effekte legt tiefgreifende Einflüsse des $\text{Ca}_v1.2$ auf das Immunsystem nahe, die bislang nur oberflächlich beschrieben wurden.

Methodologisch setzten diese Studien meist auf eine negative pharmakologische Modulation des Kanals. Die als spezifisch für spannungsabhängige Calciumkanäle vom L-Typ geltenden Inhibitoren vom Dihydropyridintyp werden bei sehr häufigen Diagnosen, wie essentieller arterieller Hypertonie und stabiler Angina Pectoris, mit knapp 2 Milliarden definierten Tagesdosen pro Jahr allein in Deutschland vielfach eingesetzt [38]. Aufgrund etwaiger unerwünschter Arzneimittelwirkungen auf das Immunsystem erscheinen detaillierte Untersuchungen der Rolle von $\text{Ca}_v1.2$ im Immunsystem somit dringend nötig.

Generell ist der Einsatz pharmakologischer Modulatoren für grundlagenwissenschaftliche Untersuchungen nicht die ideale Methode. So sind etwaige pleiotrope Auswirkungen der Dihydropyridine zum Beispiel auf das Herz-Kreislauf-System oder Effekte auf andere Organe, Gewebe und Mechanismen nicht auszuschließen. Dagegen können Tiermodelle mit genetischer Alteration des Kanals gezielt diese Einschränkungen überwinden. Bisher wurden jedoch keine Studien

veröffentlicht, in denen eine genetisch funktionsgeänderte Version des $\text{Ca}_v1.2$ hinsichtlich ihrer Effekte im Immunsystem untersucht wurde.

2.2 Die Überaktivierung des $\text{Ca}_v1.2$ im Rahmen des Timothy-Syndroms und ein korrespondierendes Mausmodell

Im Jahr 2004 wurde entdeckt, dass die Überaktivierung des Kanals $\text{Ca}_v1.2$ als Ursache des Timothy-Syndroms wirkt. Dieses autosomal-dominante Syndrom ist eine Multisystemerkrankung, die sich vor allem in Herzrhythmusstörungen und autistischen Charakterzügen manifestiert. Betroffene Personen sterben im Mittel mit 2,5 Jahren an kardialen Arrhythmien [41]. Dokumentiert sind ebenfalls Immundefekte: Erkrankte Kinder haben gehäufte Bronchitiden und andere rezidivierende Infektionen [30].

Beim Timothy-Syndrom führt eine Punktmutation zum Austausch einer Aminosäure des $\text{Ca}_v1.2$. Die Punktmutation kann entweder auf Exon 8 oder auf Exon 8A des Gens für $\text{Ca}_v1.2$ liegen. Der Calciumkanal $\text{Ca}_v1.2$ wird entweder aus Exon 8 oder Exon 8A translatiert. Je nach Gewebeform sind die relativen Anteile der Spleißvarianten des $\text{Ca}_v1.2$, die aus einem der beiden Exone translatiert werden, unterschiedlich. Deswegen unterscheidet man zwischen Timothy-Syndrom 1 mit einer Punktmutation auf Exon 8A und Timothy-Syndrom 2 mit einer Punktmutation auf Exon 8. Das Timothy-Syndrom 2 gilt dabei als klinisch schwerwiegender [30].

Ein Mausmodell des Timothy-Syndrom 2 wurde 2011 etabliert und diente bereits als Grundlage zur Erforschung des autistischen Phänotyps [3]. Mäuse, die homozygot für die Timothy-2-Mutation sind (TS2^{homo}), sterben bereits intrauterin. Mäuse, die heterozygot für die Timothy-2-Mutation (TS2^{het}) sind, sterben in den ersten Tagen nach Geburt. Hierfür wird die wichtige Rolle der $\text{Ca}_v1.2$ im Rahmen des kardialen Aktionspotentials verantwortlich gemacht. Um dennoch Untersuchungen an den TS2^{het} -Mäusen durchführen zu können, wurde vor das Gen der Timothy-2-Mutante des $\text{Ca}_v1.2$ ($\text{Ca}_v1.2^{\text{mut}}$) deswegen eine Neomycin-Stoppkassette gesetzt ($\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäuse). Diese verringert die Transkription des $\text{Ca}_v1.2^{\text{mut}}$, sodass in Geweben von $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäusen etwa 25% der $\text{Ca}_v1.2$ Kanäle die Timothy-2-Mutation tragen und $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäusen lebensfähig sind [3].

2.3 Die gezielte Steigerung der Expression von $\text{Ca}_v1.2^{\text{mut}}$ in $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäusen durch das Cre/loxP-Systems

In $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäusen wird die Neomycin-Stoppkassette vor dem Genlocus des $\text{Ca}_v1.2^{\text{mut}}$ durch loxP-Sequenzen flankiert. Bei loxP handelt es sich um eine DNA-Sequenz, die spezifisch durch das Enzym Cre-Rekombinase erkannt wird. Nach Erkennung der flankierenden loxP-Sequenzen eines Genabschnittes induziert die Cre-Rekombinase eine DNA-Rekombination. Dabei wird die von den loxP-Sequenzen flankierte DNA-Sequenz – in diesem Fall die Neomycin-Stoppkassette – exzidiert und die freien, angrenzenden DNA-Enden werden ligiert [6]. Die Transkription des $\text{Ca}_v1.2^{\text{mut}}$ -Transgens wird auf diese Weise potentiell erhöht.

Je nach Konstruktion des Cre-Transgens, kann die Cre-Rekombinase induzierbar oder zelltypspezifisch exprimiert werden. Hierzu wurden in diesem Projekt folgende drei Mauslinien eingesetzt:

- In CD4Cre-Mäusen wird die Cre-Rekombinase konstitutiv in allen T-Zellen exprimiert [28]. Durch Kreuzung von CD4Cre-Mäusen mit $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäusen wurden $\text{TS2}^{\text{het-neo-CD4Cre}}$ generiert. In diesen ist die Expression von $\text{Ca}_v1.2^{\text{mut}}$ in T-Zellen potentiell erhöht.
- In LysMCre-Mäusen wird die Cre-Rekombinase konstitutiv in myeloiden Zellen der Granulozyten- und Makrophagenlinie exprimiert [12]. In $\text{TS2}^{\text{het-neo-LysMCre}}$ -Mäusen ist die Expression von $\text{Ca}_v1.2^{\text{mut}}$ also in Granulozyten und Makrophagen potentiell gesteigert.
- In Mx1Cre-Mäusen [26] steht die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Interferon-responsiven Mx1-Promotors. In Zellen, auf die Typ 1 Interferon einwirkt, wird der Mx1-Promotor aktiviert und so die Cre-Rekombinase transkribiert. In $\text{TS2}^{\text{het-neo-Mx1Cre}}$ -Mäusen wird also die Expression von $\text{Ca}_v1.2^{\text{mut}}$ durch Interferon induzierbar potentiell erhöht.

Der Einsatz dieser drei Mauslinien erlaubt die gezielte Untersuchung verschiedener Funktionen des Immunsystems.

2.4 Modulation von L-Typ Calciumkanälen durch Behandlung mit Nifedipin und Bay K8644

Über den Einsatz der oben beschriebenen TS2^{het}-neo-Mauslinie mit der Ca_v1.2 aktivierenden Punktmutation hinaus wurden für dieses Projekt auch die Ca_v1.2-modulierenden Substanzen Nifedipin und Bay K8644 eingesetzt. Hierbei handelt es sich um Vertreter der Dihydropyridine, einer Gruppe von Modulatoren der L-Typ-Kanäle, zu denen auch Ca_v1.2 zählt [31]. Nifedipin ist ein klinisch häufig eingesetztes Antihypertensivum und wirkt, indem es die Öffnungswahrscheinlichkeit der L-Typ-Calciumkanäle verringert [44]. Bay K8644 wird insbesondere experimentell eingesetzt, um Funktionen der L-Typ-Calciumkanäle zu untersuchen. Es erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit der L-Typ-Calciumkanäle [42].

Durch Einsatz der Modulatoren an L-Typ Calciumkanälen Nifedipin und Bay K8644 werden die Beobachtungen der Wirkung des Ca_v1.2 auf das Immunsystem in TS2^{het}-neo-Mäusen ergänzt.

2.5 Modelle zur Untersuchung des Einflusses des Ca_v1.2 auf das Immunsystem

2.5.1 Die akute Infektion der Maus mit dem LCM-Virus

Die Infektion der Maus mit dem Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) löst eine sehr starke und gut reproduzierbare Immunreaktion aus [33, 47]. In der akuten Primärinfektion sind vor allem zytotoxische CD8⁺-T-Zellen notwendig und hinreichend für die Kontrolle des Virus [24]. Bei Infektion mit dem LCMV wird allerdings auch eine starke Antikörperantwort der B-Zellen induziert [11].

Mit dem Modell der Infektion der Maus mit dem LCMV wurden in den letzten Jahrzehnten grundlegende Prinzipien der zellulären Immunantwort aufgeklärt. Die Arbeiten über die Immunantwort gegen das LCMV behandeln dabei einen breiten Themenkomplex, vom T-Zell-Gedächtnis bis hin zur Infektion mit dem HIV, und wurden teils auch mit dem Nobelpreis gewürdigt [46].

2.5.2 Die akute Infektion der Maus mit *L. monocytogenes*

Der Verlauf der intraperitonealen Infektion von Mäusen mit *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) wurde in den letzten Jahrzehnten sehr detailliert charakterisiert [16]. In den ersten Tagen nach Infektion kommt es insbesondere zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Diese bilden unter anderem durch Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und Phagozytose von Bakterien eine der ersten, sehr wichtigen Linien der Immunabwehr [43]. Später setzt die erregerspezifische T-Zell-Antwort ein.

Durch das Modell der Infektion von Mäusen mit *L. monocytogenes* wurden wichtige Aspekte der antibakteriellen Abwehr aufgedeckt. Hierunter fallen zum Beispiel Interaktionen zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem sowie Funktionen wichtiger Zytokine des angeborenen Immunsystems [35].

2.5.3 Das Mausmodell der Ovalbuminallergie

Allergien sind in Deutschland eine der häufigsten chronischen Erkrankungen. Fast jeder Dritte ist betroffen [27]. Zumeist handelt es sich bei typischen Symptomen wie Pollinosis, Konjunktivitis oder asthmatischen Beschwerden um Manifestationsformen von Allergien vom Soforttyp (Typ-I-Allergien).

Durch Sensibilisierung und Provokation mit Ovalbumin wird in Mäusen eine Typ-I-Allergie ausgelöst [19]. Vorbefunde der Arbeitsgruppe Pelletier deuten an, dass die Funktion des Cav1.2 bei der Entstehung von Typ-1-Allergien eine entscheidende Rolle spielt [9, 19]. Der genaue Einfluss des Cav1.2 auf die Sensibilisierung im Rahmen von Typ-I-Allergien wurde allerdings bislang nicht aufgeklärt.

2.6 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, immunologische Funktionen des spannungsabhängigen Calciumkanals $\text{Ca}_v1.2$ zu identifizieren und zu charakterisieren. Hierzu soll insbesondere das in der immunologischen Forschung bislang noch nicht eingesetzte Mausmodell des Timothy-Syndrom 2 mit $\text{Ca}_v1.2$ -aktivierender Mutation genutzt werden. Mit diesen Mäusen soll die Rolle des $\text{Ca}_v1.2$ in zwei komplementären Infektionsmodellen und einem Allergiemodell erforscht werden. So sollen jeweils unterschiedliche Funktionsbereiche des Immunsystems analysiert werden.

Die von dieser Arbeit erwarteten Erkenntnisse sollen helfen, die physiologische Rolle des immunologisch wenig erforschten $\text{Ca}_v1.2$ grundlegend besser zu verstehen. Zudem sollen bisher übersehene unerwünschte Arzneimittelwirkungen und neue Potentiale des klinischen Einsatzes von Modulatoren des $\text{Ca}_v1.2$ aufgedeckt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Medien, Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem oder zweifach- destilliertem (_{dd}) Wasser aus der EASYpure UV/UF Anlage (Werner Reinstwassersysteme) angesetzt, autoklaviert (121° C, 20 min) oder sterilfiltriert (Filter 0,2µm, Braun) und bei Raumtemperatur oder 4° C gelagert.

Produkt	Beschreibung	Hersteller
⁵¹ Chrom	Natriumchromat, ⁵¹ Chrom, 74 MBq	Hartmann-Analytik
Alum	Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	Sigma-Aldrich
Bay K8644	Lagerung bei 4° C lichtgeschützt	Sigma-Aldrich
Blockpuffer	PBS mit 1% BSA	Arbeitsgruppe Utermöhlen
BSA	Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich
BHI-Medium	Brain Heart Infusion Broth	Beckton Dickinson
DCF	Dichlorfluoreszin, Lagerung lichtgeschützt bei -20° C	Invitrogen
DCF-Lösung	20 µl DCF in HBSS	Arbeitsgruppe Utermöhlen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Biochrom
DMEM++	DMEM mit 5% FKS und 1% P/S	Arbeitsgruppe Utermöhlen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, 0,1 M Lösung in Wasser	Sigma-Aldrich
FKS	Fetales Kälberserum, keimfrei filtriert, gelagert bei -20° C und vor Gebrauch 30 min bei 56° C inaktiviert	Biochrom
HBSS	Hanks' Balanced Saline Solution mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	life technologies
HRP	Meerrettichperoxidase	Invitrogen

HRP-Streptavidin	Meerrettichperoxidase, mit Streptavidin konjugiert	Invitrogen
Isoluminol	Lagerung lichtgeschützt bei -20° C	Invitrogen
Isoluminol-Lösung	25 µl Isoluminol und 200 µl HRP in 12,5 ml HBSS	Arbeitsgruppe Utermöhlen
LCMV-Antigen	Isoliertes LCMV in GNTE-Puffer, gelagert bei -80° C	Arbeitsgruppe Utermöhlen
L-Glutamin	200 mM	Biochrom
Methylcellulose-Medium	Zu gleichen Teilen Methylcellulose-Lösung und Zweifach-Medium	Arbeitsgruppe Utermöhlen
Methylcellulose-Lösung	Methylcellulose, 1,8% in Wasser gelöst, autoklaviert	Merck
NaCl	Natriumchlorid	Merck
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich
Nifedipin	Reinheit > 98%, Lagerung bei 4° C, lichtgeschützt	Sigma-Aldrich
Ovalbumin		Sigma-Aldrich
P/S	Penicillin (10.000 U/ml), Streptomycin (10 ng/ml) in Wasser gelöst, Lagerung bei -20° C	Biochrom
PBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung	Biochrom
PBS++	PBS mit 2 mM EDTA und 0,5% BSA	Arbeitsgruppe Utermöhlen
Pyruvat	100 mM	Biochrom
Stopp-Lösung	2 N Schwefelsäure	R&D Systems
Substrat-Lösung	Substrat A: Wasserstoffperoxid unverdünnt Substrat B: Tetramethylbenzidin unverdünnt	R&D Systems
Triton-X-10	1,6% in ddH ₂ O	Sigma-Aldrich
Trypanblau	0,4%, steril filtriert in 0,81% NaCl und 0,06% Kalium in H ₂ O	Sigma-Aldrich
Trypsin	Stammlösung zehnfach konzentriert	Biochrom
Tween-20	10% Polysorbat 20 in H ₂ O	ICN Biomedicals
Waschpuffer	PBS mit 0,05% Tween-20	Arbeitsgruppe Utermöhlen
Zweifachmedium	20% 10x DMEM, 220 mg/l Pyruvat, 7,4 g/l NaHCO ₃ , 1160 mg/l L-Glutamin, 2% P/S, 10% FKS in Wasser	Arbeitsgruppe Utermöhlen

3.1.2 Antikörper

<u>Produkt</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
anti-CD11b	Ratte (IgG2), anti-Maus CD11b, mit APC konjugiert bzw. magnetisch	eBioscience bzw. Miltenyi Biotec
anti-CD4	Ratte (IgG2b), anti-Maus CD4, mit PE konjugiert	eBioscience
anti-CD8	Ratte, anti-Maus CD8a, mit APC konjugiert bzw. magnetisch	eBioscience bzw. Miltenyi Biotec
anti-F4/80	Ratte (IgG2a), anti-Maus F4/80, mit PE konjugiert	eBioscience
anti-Gr1	Ratte (IgG2b), anti-Maus Ly6c und Ly6g, mit FITC konjugiert	BD Biosciences
anti-IgE	Ratte (IgG1), anti-Maus IgE, mit Biotin-konjugiert	eBioscience
anti-IgG	Ziege, anti-Maus IgG (H+L), mit HRP konjugiert	life technologies
anti-IgM	Ziege, anti-Maus IgM (MU), mit HRP konjugiert	life technologies
IL-4 ELISA-Set	mouse IL-4	R&D Systems

3.1.3 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Durchflusszytometer	FACS Calibur	Becton Dickinson
Gammazähler	COBRAII, Auto-Gamma	Canberra-Packard
Gewebedissoziator	Octo Dissociator	Miltenyi Biotec
Inkubator	Hera Cell 240	Heraeus
Koloniezähler	Flash&Go	IUL
Magnet und Separator	OctoMACS	Miltenyi Biotec
Mikroplattenleser	TriStar LB941 TriStar 2	Berthold Technologies
Schüttelinkubator	innova 4200	GMI
Schüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf
Spiralplattensystem	Eddy Jet	IUL

Standard-Mikroskop	Telaval 31	Zeiss
Sterilbank	Herasafe	Heraeus
Waage		Sartorius
Zählkammer	0,100 mm Tiefe, 0,025 mm ²	Neubauer
Zentrifuge	Centrifuge 5417 C Megafuge 1.0 R	Eppendorf Heraeus

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

<u>Produkt</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
6-Lochplatten	Makroplatte mit sechs Vertiefungen	Nunc
ELISA-Platten	Mikrotiterplatte, Polystyren	Nunc
FACS-Probenröhrchen	5 ml-Röhrchen, steril	Beckton Dickinson
Gewebedissoziationsröhrchen	C Tubes	Miltenyi Biotec
Kanülen	Einmalkanülen, steril, unterschiedliche Größen	Terumo
Kulturflaschen	50 ml und 200 ml Zellkulturflaschen	Biochrom und Nunc
Küvetten	10 x 4 x 45 mm	Sarstedt
MACS-Säulen	Säulen für magnetische Sortierung, 1 x 10 ⁴ bis 2 x 10 ⁸ positive Zellen	Miltenyi Biotec
Mikroreaktionsgefäß	1,5 ml	Sarstedt
Mikrotiterplatten	Rundboden- oder Flachboden-Gewebekulturplatten mit 96 Vertiefungen, Polypropylen, steril	Biochrom
Petrischalen	40 x 10 mm, steril	Biochrom
Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml, Polystyrol und steril	Sarstedt
Pipettenspitzen	1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl, mit und ohne Filter	STARLAB
Probenröhrchen	15 ml und 50 ml	Cellstar
ROS-Platten	Mikrotiterplatten weiß und schwarz, Flachboden, unbehandelt, steril	Thermo Scientific

Schafsblut-Agar-Platten		Heipha
Serumröhrchen	Microvette	Sarstedt
Spritzen	1 ml, 2ml, 5 ml und 10 ml Einmalspritzen, steril	Braun Melsungen

3.1.5 Datenverarbeitungsprogramme

<u>Einsatz</u>	<u>Software</u>	<u>Hersteller</u>
Auszählung Bakterienkulturen	Flash&Grow 1.2	IUL
Durchflusszytometer	Cell Quest Pro	Becton Dickinson
Grafiken	SigmaPlot 13 Prism 5	Systat GraphPad
Auslesung Mikrotiterplatten	MikroWin 2000	Mikrotek

3.1.6 Mausezucht

TS2^{het}-neo-Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe Shamloo generiert [3] und für dieses Projekt freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Hintergrund aller eingesetzten Mauslinien ist der C57BL/6 –Stamm.

Für die Experimente wurden Mäuse im Alter von 6-12 Wochen eingesetzt.

Jeder Umgang mit Tieren fand unter Einhaltung des Deutschen Tierschutzgesetzes statt und wurde wie vorgeschrieben von nach FELASA-Richtlinien geschultem Personal durchgeführt.

Die Mausezucht erfolgte unter von spezifischen Pathogenen freien (SPF) Bedingungen im Mausstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene des Universitätsklinikums Köln.

Durch Verpaarung von TS2^{het}-neo-Mäusen

- mit CD4Cre-Mäusen wurden TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäuse generiert, in denen die Expression der Cav1.2-Variante mit der Timothy-2-Mutation (Cav1.2mut) in T-Zellen potentiell gesteigert ist.
- mit Mx1Cre-Mäusen wurden TS2^{het}-neo-Mx1Cre generiert, in denen die Expression des Cav1.2mut nach Stimulation mit Interferon im gesamten Organismus potentiell gesteigert ist.
- mit LysMCre-Mäusen wurden TS2^{het}-neo-LysMCre-Mäuse generiert, in denen die Expression des Cav1.2mut in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten potentiell gesteigert ist.

3.2 Methoden

3.2.1 Datenevaluation

Zur Auswertung der Daten wurde jeweils das arithmetische Mittel der jeweiligen Experimente gewählt. Diese sind in den Abbildungen zusammen mit den entsprechenden Werten für die Standardfehler festgehalten.

Der p-Wert wurde im Experiment für Abbildung 9 durch den Mantel-Cox-Test und im Experiment für Abbildung 15 durch den t-Test bestimmt.

3.2.2 Zelllinien, Zellkultur und Zellzählung

Die Simian Virus 40 (SV40) -transformierten Maus-Embryo-Fibroblasten der C57BL/6 Maus (C57BL/SV-Zellen) sowie L929-Zellen werden in der AG Utermöhlen routinemäßig eingesetzt.

Die verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit DMEM mit 5% FKS bei 37° C in 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden jeden zweiten bis dritten Tag mit Trypsin vereinzelt und in einer Verdünnung von 1:5 passagiert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Bestimmung der Zelldichte in Zellsuspensionen erfolgte über das Trypanblau-Ausschlussverfahrens in einer Zählkammer nach Neubauer nach folgender Formel:

$$\text{Zelldichte pro ml} = \text{Vitale Zellen pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000$$

3.2.3 Infektion der Mäuse mit dem LCMV

Zur Infektion der Mäuse wurde das LCM-Virus des Stammes WE eingesetzt. Das Virus wurde in L929-Zellen vermehrt und als Plaque-bildende Einheiten (PFU) quantifiziert [29]. Da Mäuse zehnmal sensitiver auf das Virus reagieren als L-Zellen in vitro, wurden die PFU für Experimente in vivo durch Multiplikation mit dem Faktor 10 in mausinfektiöse Einheiten (MIE) umgerechnet. Die Infektion der Versuchstiere erfolgte durch intravenöse Injektion von 10^5 MIE LCMV in 0,3ml PBS mit 2% FKS und 1% P/S.

3.2.4 Umgang mit *Listeria monocytogenes*

Zur Infektion von Mäusen wurden Listerien vom Stamm EGD, Serotyp 1/2a, aus dem bei -80° C gelagerten Vorrat in 5 ml BHI in Suspension gebracht und für mindestens 12 Stunden bei 37° C unter ständiger Bewegung im Brutschrank kultiviert. 1 ml der Kultur wurde in 25 ml angewärmtes BHI überimpft und für weitere 90 min bis zum Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (Optische Dichte von 0,3 bei 600 nm) im Brutschrank kultiviert

Nach dreimaligen Waschen (3.350 g, 10 min, 4° C) wurden die Listerien in 1 ml eiskaltem PBS aufgenommen. Die Optische Dichte bei 600 nm einer 1/25-Verdünnung der Suspension wurde bestimmt und die Bakteriendichte nach folgender Formel bestimmt:

$$CFU \text{ pro ml} = OD600 \times 25 \times 5 \times 10^8$$

Die Listerien wurden mit PBS auf die gewünschte Dichte verdünnt und auf Eis gelagert. Zur Infektion der Mäuse mit Listerien wurden 5×10^4 Listerien in 200 µl PBS den Mäusen intraperitoneal injiziert.

Zur Hitzeinaktivierung von Listerien wurden Aliquots der bei -80° C gelagerten Listerien aufgetaut und für 1 Stunde bei 60° C im Wasserbad erhitzt [2].

3.2.5 Sensibilisierung von Mäusen gegen Ovalbumin

Die Sensibilisierung von Mäusen gegen Ovalbumin orientierte sich an einem Protokoll der Arbeitsgruppe Pelletier [19]. Hierbei wurden Mäuse mit 100 µg Ovalbumin und 2 mg Alum gelöst in 200 µl PBS intraperitoneal sensibilisiert. An den Tagen 15-19 erfolgte täglich die intranasale Stimulation mit 125 µg Ovalbumin gelöst in 50 µl PBS.

3.2.6 Gewinnung von Serumproben aus Mäusen

Vollblutproben wurden durch Punktion der Vena facialis von Mäusen gewonnen, für 30 min bei Raumtemperatur in einer Microvette inkubiert und anschließend für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde abpipettiert und bei -20° C gelagert.

3.2.7 Entnahme von Leber, Milz und Milzzellsuspensionen

Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Das Peritoneum wurde durch einen transversalen Bauchschnitt eröffnet und die Milz beziehungsweise Leber entnommen.

Zur Gewinnung von Milzzellsuspensionen wurden Milzen gewogen und anschließend mit dem Stempel einer 2 ml-Spritze durch ein Nylonsieb mit der Porengröße 70 µl passagiert und in eiskaltem DMEM++ suspendiert. Die entstandenen Suspensionen wurden bei 300 g und 4° C für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Erythrozyten wurden durch Zugabe von 0,2% NaCl für 10 Sekunden lysiert. Isotonische Bedingungen wurden durch Hinzufügen von 1,6% NaCl wiederhergestellt. Nach einer zweiten Zentrifugation bei 300 g und 4° C für 5 min wurden die Zellen in 5 ml DMEM++ aufgenommen und gezählt.

3.2.8 Gewinnung von Peritonealzellen

Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Ihr Fell wurde auf Nabelhöhe transversal angeschnitten und durch axialen Zug in beide Richtungen vom subkutan liegenden Gewebe getrennt. Das Peritoneum blieb dabei unverletzt. Eine 10 ml Spritze mit 20 Gauge Kanüle wurde mit 8 ml eiskaltem PBS++ gefüllt unter Sicht in die Peritonealhöhle eingeführt. Das PBS++ wurde eingespritzt und die Suspension aspiriert.

Die Suspensionen wurden bei 300 g und 4° C für 5 min zentrifugiert. Erythrozyten wurden durch Zugabe von 0,2% NaCl für 10 Sekunden lysiert. Isotonische Bedingungen wurden durch Hinzufügen von 1,6% NaCl wiederhergestellt. Nach einer zweiten Zentrifugation bei 300 g und 4° C für 5 min wurden die Zellen in 5 ml DMEM++ aufgenommen und gezählt.

3.2.9 Bronchoalveoläre Lavage an Mäusen

Nach zervikaler Dislokation von Mäusen wurde die Trachea freipräpariert und durch Schnitt mit einem Skalpell zur Hälfte eröffnet. Eine stumpf gekürzte 20 Gauge Kanüle wurde in den aboral des Schnittes gelegenen Teil der Trachea eingeführt und mit einem Faden angeschlungen und fixiert, um den Austritt von Spülflüssigkeit zu vermeiden. Das Bronchialsystem wurde fünf Mal mit je 0,9 ml eiskaltem PBS++ gespült.

3.2.10 Bakterienlast in Leber und Milz

Zur Bestimmung der Listerienlast in Leber und Milz wurden die entnommenen Organe gewogen, in 3 ml PBS im Gewebedissoziator nach Anleitung des Herstellers (Miltenyi Biotec) homogenisiert und in unterschiedlichen Verdünnungen mit einem Spiralplattensystem (IUL) auf Blutagarplatten ausgestrichen. Nach einer Nacht im Brutschrank bei 37° C wurde die Anzahl der Bakterienkolonien auf den jeweiligen Platten durch einem Koloniezähler (IUL) automatisch unter optischer Plausibilitätskontrolle bestimmt. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung und

der Organgewichte wurde die Bakterienlast in koloniebildenden Einheiten (CFU) pro Gramm Organ ermittelt.

3.2.11 Immunmagnetische Anreicherung von Zellsuspensionen

Zur Anreicherung von CD8⁺ T-Zellen aus Milzen oder CD11b⁺ Makrophagen aus der Peritonealhöhle wurden Zellsuspensionen nach Anleitung des Herstellers (Miltenyi Biotec) mit paramagnetischen Antikörpern des jeweiligen Differenzierungsmarkers für 20 min auf Eis markiert, dreimal gewaschen, in PBS++ resuspendiert und auf LS-Säulen gegeben.

Für den jeweiligen Differenzierungsmarker positive Zellen wurden durch das anliegende Magnetfeld in der Säule gehalten, während nicht markierte Zellen durch mehrmaliges Spülen mit PBS++ ausgewaschen wurden. Die zurückgehaltenen Zellen wurden nach Entfernung des Magnetfeldes eluiert, zentrifugiert, in DMEM++ resuspendiert und gezählt.

3.2.12 Durchflusszytometrie

In PBS++ suspendierte Milz- oder Peritonealzellen wurden durch Inkubation für 20 min mit dem jeweiligen Antikörper markiert. Dieser war je nach Experiment spezifisch für CD4 oder CD8 beziehungsweise Gr1 oder F4/80 und CD11b. Für jeden Messansatz wurden etwa 0,5 - 1 x 10⁶ Zellen und etwa 0,5 µl des Antikörpers eingesetzt. Die gefärbten Zellen wurden durch zwei Waschschrte von überschüssigen Antikörpern getrennt.

Die in PBS++ resuspendierten Zellen wurden im FACS-Calibur auf Größe und Granularität sowie auf Fluoreszenz gemessen und in einem Dot Plot dargestellt. Anhand der Größe und Granularität wurden die Milzzellen beziehungsweise Peritonealzellen von sonstigen Bestandteilen der Suspension – z.B. Organresten der Milz – differenziert. Anhand der Fluoreszenz wurde die Expression der Oberflächenantigene einzelner Zellen der Milzzellen beziehungsweise Peritonealzellen bestimmt. Es wurden jeweils mindestens 10.000 Zellen untersucht.

3.2.13 Virustitration

An definierten Tagen nach LCMV-Infektion der Mäuse wurden die Milzen steril entnommen. Zwei Drittel der Milz wurden für die Herstellung von Einzelzellsuspensionen und ein Drittel für die Analyse der Viruslast in der Milz verwendet. Hierfür wurde zunächst das Gewicht des Teilstückes bestimmt, um später den Verdünnungsfaktor des Homogenates zu berechnen. Im Octo Dissociator wurde das Teilstück der Milz in PBS mit 2% P/S und 1% FKS homogenisiert. Dieses Homogenisat wurde bei 300 g und 4° C für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand in drei Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80° C gelagert.

Für die Titration der Viruslast wurden 2 ml einer Zellsuspension mit der Dichte von $1,2 \times 10^5$ L929-Fibroblasten/ml in DMEM++ in jede Vertiefung einer 6-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät und anschließend 16 bis 18 Stunden bei 37° C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Organhomogenisate aufgetaut und in einer 1:10-Verdünnungsreihe in PBS mit 2% P/S und 1% FKS verdünnt. Anschließend wurde das Medium auf den 6-Loch-Mikrotiterplatten abgesaugt und je 100 µl von den Verdünnungen der Homogenisate in Doppelbestimmungen auf die L929-Zellen gegeben. Nach Inkubation für 30 min bei 37° C und 5% CO₂ im Brutschrank wurden jedem Ansatz 2 ml Methylzellulose-Medium zugefügt. Nach drei Tagen Inkubation im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ wurden 1,5 ml warmes DMEM++ zugegeben. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Medium von den 6-Loch-Mikrotiterplatten abgenommen und der Zellrasen mit einer 0,2% Kristallviolett-Lösung für 15 min gefärbt. Nach Trocknung wurden die virusinduzierten Plaques auf den Platten gezählt. Ein Plaque wurde jeweils durch ein infektiöses LCMV-Partikel erzeugt. Über den Verdünnungsfaktor und das Gewicht des homogenisierten Milzteils wurde die Viruslast in Plaque-bildenden Einheiten pro Gramm Milz berechnet.

3.2.14 $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest

Zur Bestimmung der virusspezifischen zytotoxischen Aktivität von CD8^+ Zellen wurde der $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest eingesetzt. Es wurde das Protokoll von Brunner [8] mit Modifikation nach Gegin [17] genutzt.

Die virusspezifische zytolytische Aktivität der vollständigen Milzzellsuspensionen und der immunmagnetisch angereicherten CD8^+ Zellen, wurde an Tag 8 nach Infektion mit dem LCMV untersucht. Hierzu wurden Milzzellen beziehungsweise CD8^+ Zellen aus Mäusen wie beschrieben präpariert und als Effektorzellen eingesetzt.

Vorbereitung der Zielzellen

Für den $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest wurden $^{51}\text{Chrom}$ -markierte, syngene, LCMV-infizierte C57/SV-Maus-Embryo-Fibroblasten als Zielzellen eingesetzt. Diese wurden zwei Tage vor dem Test in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Petrischale in DMEM++ ausgesät und nach der Adhäsion mit dem LCMV in einer Multiplizität der Infektiösität (MOI) von 0,01 infiziert. Am Tag des $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstests wurden die Zielzellen mit Trypsin vereinzelt, in DMEM++ aufgenommen und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. In dieser Dichte wurden die Zielzellen mit 1,85 MBq $^{51}\text{Chrom}$ 60 min bei 37°C inkubiert. Radioaktives Chrom akkumuliert im Zytoplasma. Nicht aufgebundenes $^{51}\text{Chrom}$ wurde durch drei Waschschrte entfernt. Die Zellen wurden in der Zählkammer nach Neubauer gezählt und auf 3×10^4 Zellen/ml eingestellt.

Testdurchführung

Die Effektorzellen wurden in DMEM++ auf 3×10^6 Zellen pro ml eingestellt und je 200 μl in drei Parallelansätze in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit U-Boden ausgesät. Durch eine anschließende dreistufige 1:2-Verdünnung in DMEM++ wurden vier Dichten von Effektorzellen hergestellt. Auf die verdünnten Effektorzellen wurden pro Vertiefung 3×10^3 Zielzellen in 100 μl gegeben, sodass die Effektorzellen zu den Zielzellen in Verhältnissen von 100:1, 50:1, 25:1 und 12,5:1 vorlagen.

Um die spontane Freisetzung des $^{51}\text{Chroms}$ aus den Zielzellen zu bestimmen, wurden in drei Vertiefungen Zielzellen in Medium ohne Effektorzellen ausgesät. Die maximale $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzung wurde ebenfalls in drei Parallelansätzen durch Zugabe von 1,6%igem Triton-X-100 in $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ zu den Zielzellen bestimmt. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Ansätze bei 300 g für 5 min zentrifugiert und 100 μl der zellfreien Überstände aus jeder Vertiefung in Proberöhrchen überführt. Die $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzung wurde als Zerfall pro Minute (counts per minute, CPM) mit einem Gammazähler COBRAII gemessen und die Mittelwerte der Parallelansätze für jedes Effektor/Zielzellen-Verhältnis berechnet. Die spezifische Lyse wurde als prozentuale Lyse der Zielzellen nach folgender Formel errechnet:

$$\% \text{ Spezifische Lyse} = \frac{\text{CPM}_{\text{Probe}} - \text{CPM}_{\text{spontan}}}{\text{CPM}_{\text{maximal}} - \text{CPM}_{\text{spontan}}} \times 100\%$$

Behandlung der Effektorzellen mit Nifedipin und Bay K8644

In einigen Experimenten wurde der $^{51}\text{Chrom}$ freisetzungstest unter Behandlung der Effektorzellen mit definierten Konzentrationen Nifedipin oder Bay K8644 durchgeführt. Hierfür wurden die Effektorzellen vor Durchführung des $^{51}\text{Chrom}$ freisetzungstest mit den jeweiligen Konzentrationen der eingesetzten Substanz für eine Stunde bei 37°C und 5% CO_2 präinkubiert und die angegebene Konzentration während des vierstündigen Tests durch Einsatz der jeweiligen Substanz in dem Verdünnungsmedium DMEM++ und der Zielzellsuspension gehalten.

3.2.15 ROS-Messung

Messung der Produktion von intrazellulären ROS mit DCF

In eine schwarze 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden pro Vertiefung 5×10^5 CD11b⁺ Zellen in Dreifachansätzen in einem Volumen von 100 µL DMEM++ ausplattiert und über Nacht bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Nach einem Waschschrift (300 g, 5 min) mit 100 µL HBSS wurden die Zellen für 15 min bei 37° C mit 100 µL DCF-Lösung inkubiert.

Ab dem folgenden Schritt wurde das Experiment auf Eis durchgeführt. Nach einem Waschschrift erfolgte die Koinkubation der Zellen mit hitzeinaktivierten Listerien (HKLM). Hierfür wurden $2,5 \times 10^7$ HKLM in 50 µL HBSS in jede Vertiefung gegeben. Vertiefungen, in denen keine Koinkubation mit HKLM erfolgen sollte, wurden mit 175 µL HBSS befüllt. Die Platte wurde für 5 min bei 850 g zentrifugiert. In mit HKLM koinkubierten Vertiefungen wurde der Überstand abgenommen und 175 µL HBSS zugegeben.

Zur Behandlung mit Nifedipin und Bay K8644 wurden 25 µL der jeweiligen Substanz in HBSS hinzugefügt und die Zellen resuspendiert. Die Konzentration im Endvolumen von 200 µL entsprach 10 µM der jeweiligen Substanz. Vertiefungen, in denen keine Behandlung mit Nifedipin oder Bay K8644 erfolgen sollte, wurden mit 25 µL HBSS auf das Endvolumen von 200 µL gebracht.

Die Fluoreszenz der Platte wurde in dem auf 37° C vorgewärmten TriStar2 über einen Zeitraum von 60 min in einminütigen Intervallen bestimmt. Die Eigenfluoreszenz von HKLM und / oder Nifedipin beziehungsweise Bay K8644 wurde in Kontrollansätzen bestimmt. Diese Leerwerte wurden von den Werten der spezifischen Ansätze mit Zellen abgezogen.

Messung der Produktion extrazellulärer ROS mit Isoluminol

In eine weiße 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden pro Vertiefung 5×10^5 CD11b⁺ Zellen in Dreifachansätzen in einem Volumen von 100 µL DMEM++ ausplattiert und über Nacht bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert.

Ab dem folgenden Schritt wurde das Experiment auf Eis durchgeführt. Nach einem Waschschrift (300 g, 5 min) erfolgte die Koinkubation der Zellen mit (HKLM). Hierfür wurden $2,5 \times 10^7$ HKLM in 50 µL HBSS in jede Vertiefung gegeben. Vertiefungen, in denen keine Koinkubation mit HKLM erfolgen sollte, wurden mit 75 µL HBSS befüllt. Die Platte wurde für 5 min bei 850 g zentrifugiert. In mit HKLM koinkubierten Vertiefungen wurde der Überstand abgenommen und 75 µL HBSS zugegeben.

Zur Behandlung mit Nifedipin und Bay K8644 wurden 25 µL der jeweiligen Substanz in HBSS gelöst hinzugefügt und die Zellen resuspendiert. Die Konzentration im Endvolumen von 200 µL entsprach 10 µM der jeweiligen Substanz. Vertiefungen, in denen keine Behandlung mit Nifedipin oder Bay K8644 erfolgen sollte, wurden mit 25 µL HBSS ein Volumen von 200 µL gebracht. In allen Vertiefungen wurden 100 µL Isoluminol-Lösung hinzugefügt.

Die Lumineszenz der Platte wurde in dem auf 37° C vorgewärmten TriStar2 über einen Zeitraum von 60 min in einminütigen Intervallen bestimmt. Die Eigenlumineszenz von HKLM und / oder Nifedipin beziehungsweise Bay K8644 wurde in Kontrollansätzen bestimmt. Diese Leerwerte wurden von den Werten der spezifischen Ansätze mit Zellen abgezogen.

3.2.16 Serologie

Antikörpertiter

Zur Bestimmung von spezifischen Antikörpertitern wurden 96-Loch-ELISA-Platten für mindestens 12 Stunden mit 100 µl des jeweiligen Antigens (1 µg/ml LCMV bzw. 100 µg/ml Ovalbumin, jeweils in PBS verdünnt) präinkubiert. Nach vier Waschschritten (jeweils Zugabe von 300 µl PBS + 0,05% Tween pro Vertiefung und anschließendes Trocknenklopfen der Platte) wurden restliche Bindungskapazitäten mit PBS + 1% BSA für 1 Stunde geblockt. Das zu messende Serum wurde elf Mal in Verdünnungsschritten von 1:2 (Ovalbumin-IgE), 1:4 (LCMV-IgG, Vorverdünnung 1:50) und 1:3 (LCMV-IgM, Vorverdünnung 1:50) verdünnt. Nach vier Waschschritten wurden 100 µl der Proben in den einzelnen Verdünnungen in die Platte titriert. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur und vier Waschschritten wurden 100 µl des mit HRP konjugiertem Detektionsantikörper (anti-IgG, anti-IgM, anti-IgE, verdünnt 1:5000) zugegeben. Es folgten 2 weitere Stunden Inkubation bei Raumtemperatur. Nach vier Waschschritten wurden 100 µl einer 1 + 1 Mischung aus Substrat A und Substrat B in jede Vertiefung gegeben. Nach 20 min Inkubation in der Dunkelheit wurde die Reaktion durch 50 µl 2M HCl gestoppt. Die Optische Dichte wurde bei 450 nm bestimmt (Referenz 495 nm).

Als jeweiliger Antikörpertiter wurde die halbmaximale Optische Dichte nach Korrektur mit dem Hintergrundwert definiert. Als Titer wurde die Verdünnungsstufe der Kurve gewählt, die als letzte über dieser halbmaximalen Optischen Dichte lag.

IL 4-Serumspiegel

Die Bestimmung des IL 4-Spiegels im Serum erfolgte per ELISA nach der Anleitung des Herstellers (R&D Systems).

4 Ergebnisse

Dieses Projekt untersucht die Funktionen des spannungsgesteuerten Calciumkanals $\text{Ca}_v1.2$ im Immunsystem. Als methodischer Zugang wurde hierzu insbesondere die Verwendung transgener Mäuse gewählt, die heterozygot transgen für die $\text{Ca}_v1.2$ -aktivierende Timothy-Syndrom-2-neo-Mutation ($\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäuse) sind. An definierten immunologischen Modellen wurden gezielt verschiedene Aspekte von Immunreaktionen dieser transgenen Mäuse untersucht.

4.1 Einfluss des $\text{Ca}_v1.2$ auf die Immunantwort gegen das LCMV

4.1.1 Viruslast und Elimination des LCMV in $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäusen

Mäuse wurden intravenös mit 10^5 infektiösen Einheiten (I.E.) des Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) infiziert. Die Viruslast erreicht an Tag 4 nach Infektion ihren Höhepunkt und wurde als Virustiter in der Milz gemessen. Sowohl in $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ als auch in WT Mäusen lag der Virustiter an Tag 4 nach Infektion mit dem LCMV bei etwa 10^8 Plaque-bildenden Einheiten (plaque-forming units, PFU) pro Gramm Milz (Abb. 1A). In der frühen Phase der Infektion mit dem LCMV hatte das $\text{Ca}_v1.2\text{mut}$ -Transgen in $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäusen also keine Auswirkung auf die Viruslast.

Immunologisch relevant ist darüber hinaus die Elimination des Virus. Diese wurde durch Bestimmung des Titters an Tag 8 nach Infektion mit dem LCMV beurteilt. An Tag 8 wurden in $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ Mäusen sowie wildtypischen (WT) Wurfgeschwistern pro Gramm Milz zwischen 10^4 und 10^5 PFU des LCMV gemessen (Abb. 1A). Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 10^3 PFU/g. Beide Genotypen kontrollierten also das LCM-Virus gleich gut.

Durch die Neomycin-Stoppkassette in $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäusen wird die Expression von $\text{Ca}_v1.2\text{mut}$ im Gesamtorganismus auf niedrigem Niveau gehalten. Homozygote Timothy-Syndrom-2-Mäuse (TS2^{homo}) sind bereits intrauterin nicht lebensfähig. Auch heterozygote Mäuse ohne Stoppkassette im Transgen (TS2^{het}), in denen $\text{Ca}_v1.2\text{mut}$ konstitutiv deutlich höher exprimiert wird, sterben bereits in den ersten Tagen nach Geburt [3]. Durch die geringe Expression des $\text{Ca}_v1.2\text{mut}$ in $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäusen

könnten allerdings etwaige geringfügige Effekte des Kanals unbemerkt bleiben. Da die Stoppkassette durch loxP-Sequenzen flankiert ist, kann sie durch eine Cre-Rekombinase konditional und / oder zelltypspezifisch entfernt werden, um unter kontrollierten Bedingungen gezielt eine erhöhte Expression des $\text{Ca}_v1.2\text{mut}$ zu erreichen.

Für die Immunantwort gegen das LCMV sind insbesondere T-Zellen notwendig. Es ist deshalb naheliegend, in T-Zellen selektiv eine erhöhte Expression des $\text{Ca}_v1.2\text{mut}$ herbeizuführen. Durch Kreuzung von $\text{TS2}^{\text{het-neo-}}$ mit CD4Cre -transgenen Mäusen wurden $\text{TS2}^{\text{het-neo-CD4Cre}}$ -Mäuse generiert. In diesen Tieren wird die Cre-Rekombinase zelltypspezifisch nur in T-Zellen exprimiert und so die Expression von $\text{Ca}_v1.2\text{mut}$ in T-Zellen potentiell gesteigert.

An Tag 4 nach Infektion lag der Virustiter der Milz in $\text{TS2}^{\text{het-neo-CD4Cre}}$ Mäusen bei etwa 10^7 PFU/g und bei wildtypischen Wurfgeschwistern knapp darüber (Abb. 1B). An Tag 8 war der Titer mit etwa 10^4 bis 10^5 PFU/g in $\text{TS2}^{\text{het-neo-CD4Cre}}$ -Mäusen und WT Kontrollen gleich. Die geringen Unterschiede zwischen den Genotypen waren zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant und erschienen nicht biologisch relevant (Abb. 1B). Die Viruslast und die Elimination des LCMV blieben somit in den $\text{TS2}^{\text{het-neo-CD4Cre}}$ -Mäusen gegenüber Wildtypen unbeeinflusst.

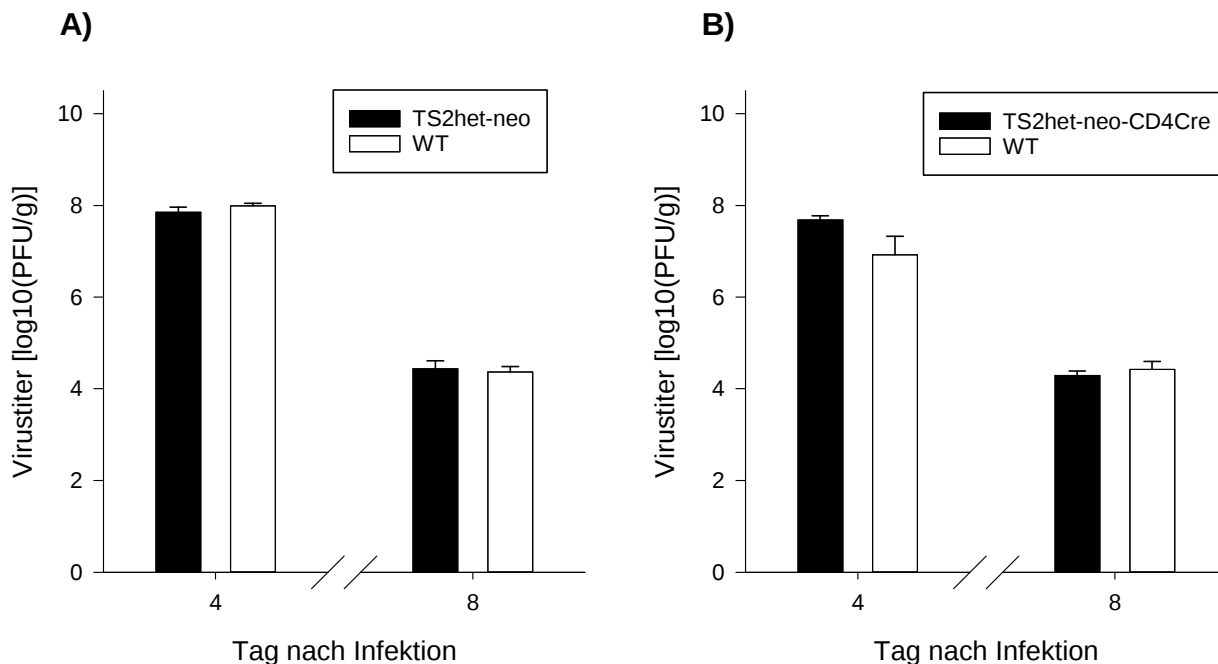


Abb. 1: Der Einfluss des $\text{Ca}_v1.2\text{mut}$ -Transgens auf die Viruslast nach Infektion mit dem LCMV.

$\text{TS2}^{\text{het-neo-}}$ (A) bzw. $\text{TS2}^{\text{het-neo-CD4Cre}}$ -Mäuse (B) und die jeweiligen WT Wurfgeschwister wurden mit 10^5 I.E. des LCMV intravenös infiziert. An Tag 4 oder 8 nach Infektion wurden die Milzen entnommen und homogenisiert. Die Viruslast in den Milzen wurde als PFU/g durch Titration auf L929-Zellen bestimmt. {Gruppengrößen: A) Tag 4: $\text{TS2}^{\text{het-neo-}}$: n = 4; WT: n = 5. Tag 8: $\text{TS2}^{\text{het-neo-}}$: n = 17; WT n = 18. B) Tag 4: $\text{TS2}^{\text{het-neo-CD4Cre}}$: n = 5; WT: n = 4. Tag 8: $\text{TS2}^{\text{het-neo-CD4Cre}}$: n = 11; WT n = 7.}

4.1.2 Die LCMV-spezifische zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen in TS2^{het}-neo-Mäusen

CD8⁺ T-Zellen sind notwendig und hinreichend für die Viruskontrolle bei akuter Infektion mit dem LCMV [24]. Ihre virusspezifische Zytotoxizität erreicht an Tag 8 nach Infektion in WT Mäusen ihr Maximum.

Milzzellen aus TS2^{het}-neo und WT Mäusen bewirkten an Tag 8 nach Infektion mit dem LCMV eine virusspezifische zytotoxische Aktivität von ungefähr 20% bei einem Verhältnis von Milzzellen zu infizierten Zielzellen (Effektor-/ Targetzellenverhältnis, E/T-Ratio) von 100:1. Erwartungsgemäß nahm die Zytolyse der Zielzellen bei verringerter E/T-Ratio für Milzzellen beider Genotypen gemäß einer langjährig bekannten Dosis-Wirkungskurve ab. Bei allen E/T-Ratios war die Lyse für TS2^{het}-neo und WT Milzzellen dabei nahezu identisch (Abb. 2A). Das Cav1.2mut-Transgen beeinflusste die virusspezifische zytotoxische Aktivität von Milzzellen aus TS2^{het}-neo-Mäusen somit nicht.

Bei Einsatz von Milzellsuspensionen als Effektoren muss beachtet werden, dass in der Milz neben CD8⁺ T-Zellen auch insbesondere B-Zellen und CD4⁺ T-Zellen vorhanden sind, aber nur die CD8⁺ T-Zellen zytolytisch aktiv sind. Um die LCMV-spezifische Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen ohne die Präsenz weiterer Zellen zu beurteilen, wurden die CD8⁺ Zellen immunmagnetisch angereichert. Durch die Anreicherung wurde sowohl bei TS2^{het}-neo-Milzen als auch bei WT Kontrollen eine Reinheit von über 95% CD8⁺ Zellen erreicht (nicht dargestellt). Bei Einsatz dieser angereicherten CD8⁺ Milzzellen als Effektoren erhöhte sich das Niveau der Lyse virusinfizierter Zielzellen auf fast 40% bei einer E/T-Ratio von 100:1. Bei CD8⁺ T-Zellen aus TS2^{het}-neo-Mäusen und WT Mäusen war die zytotoxische Aktivität bei allen E/T-Ratios nahezu gleich (Abb. 2B). Auch bei angereicherten CD8⁺ T-Zellen war somit kein Einfluss des Cav1.2mut-Transgens auf die virusspezifische zytotoxische Aktivität nachweisbar.

Die LCMV-spezifische zytotoxische Aktivität wurde auch für Milzzellen aus TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen mit potentiell gesteigerter Expression von Cav1.2mut in T-Zellen bestimmt. Sowohl für vollständige Milzellsuspensionen, als auch für angereicherte CD8⁺ Milzzellen war die virusspezifische zytotoxische Aktivität durch Effektorzellen aus TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen und WT Mäusen dabei nahezu identisch (Abb. 3). Insgesamt ließ sich somit kein Effekt der TS2-Mutation des Cav1.2 auf die virusspezifische zytotoxische Aktivität von CD8⁺-T-Zellen nachweisen.

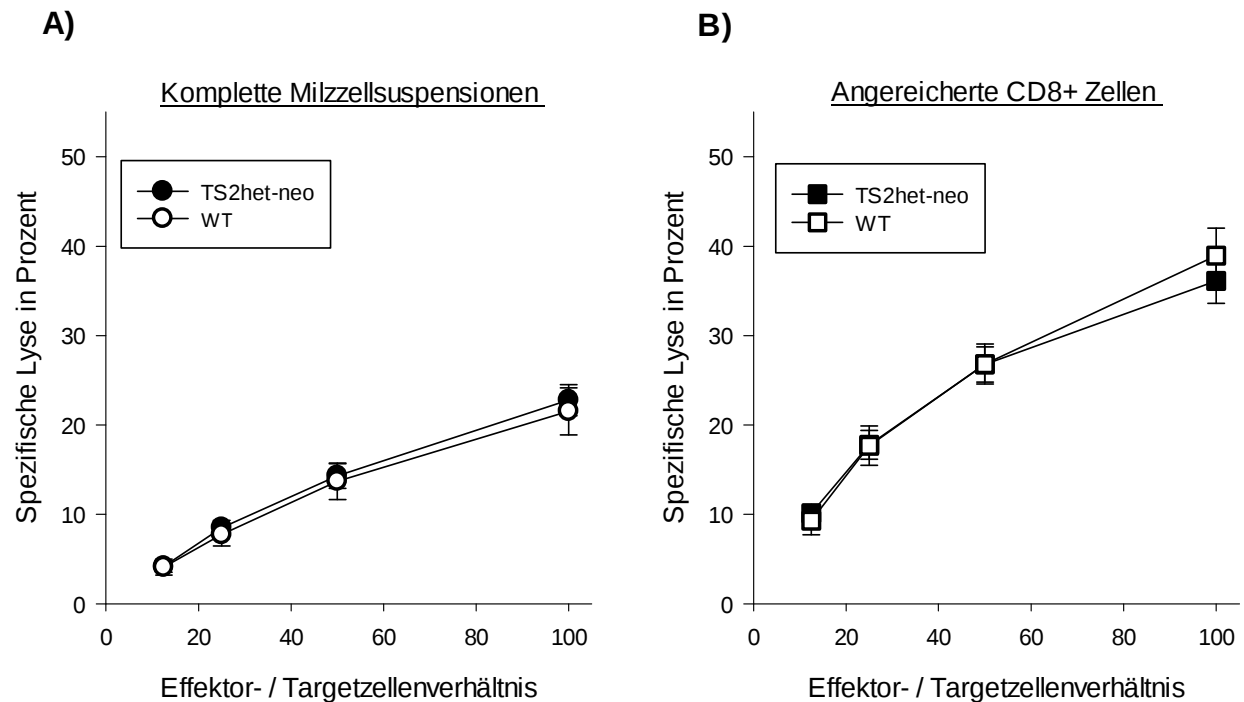


Abb. 2: Die LCMV-spezifische zytotoxische Aktivität von Milzzellen und CD8⁺ Zellen aus TS2^{het-neo} Mäusen.

TS2^{het-neo}-Mäuse und WT Wurfgeschwister wurden mit 10^5 I.E. des LCMV intravenös infiziert. An Tag 8 nach Infektion wurde die zytotoxische Aktivität von vollständigen Milzzellsuspensionen (A) oder immunmagnetisch angereicherten CD8⁺ Zellen (B) *ex vivo* im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest bestimmt. Als Zielzellen wurden C57Bl6/SV Fibroblasten eingesetzt, die zwei Tage zuvor mit dem LCMV mit einer MOI von 0,01 infiziert wurden. {Gruppengrößen: TS2^{het-neo}: n = 10; WT: n = 9.}

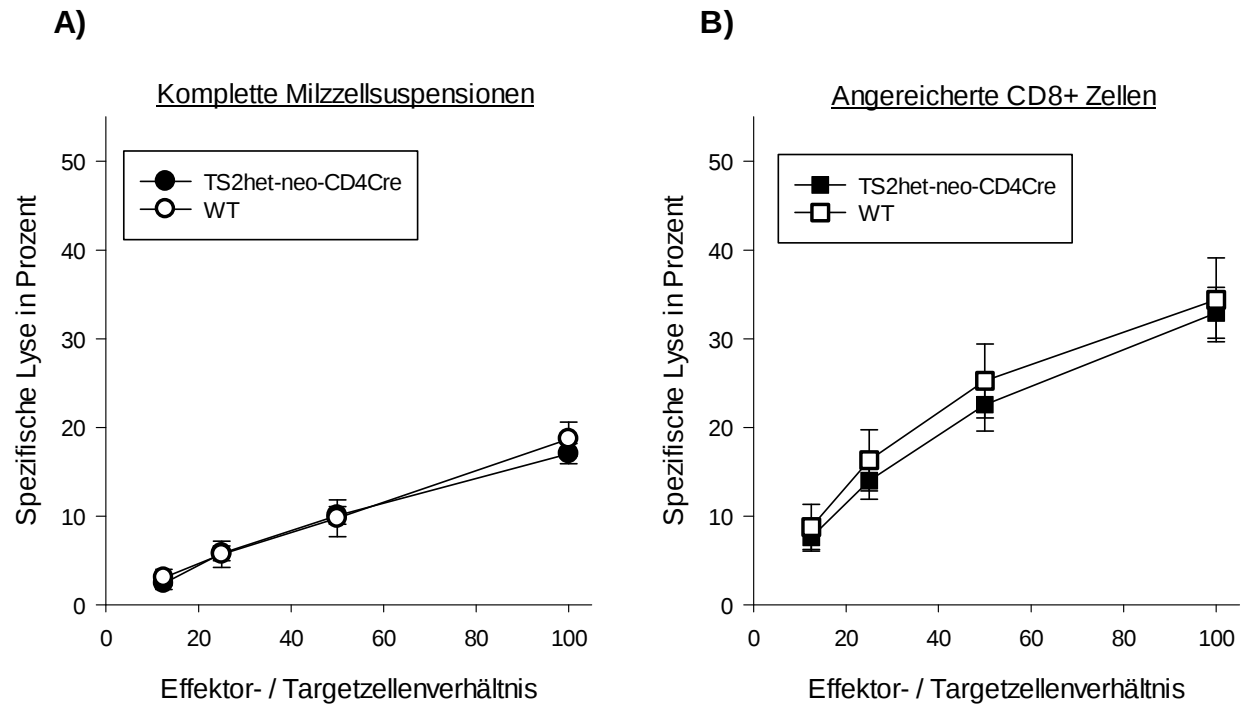


Abb. 3: Die LCMV-spezifische Zytotoxizität von Milzzellen und CD8⁺ Zellen aus TS2^{het}-neo-CD4Cre Mäusen.

T2^{het}-neo-CD4Cre- und WT Wurfgeschwister wurden mit 10⁵ I.E. des LCMV intravenös infiziert. An Tag 8 nach Infektion wurde die zytotoxische Aktivität von kompletten Milzellsuspensionen (A) oder immunmagnetisch angereicherten CD8⁺ Zellen (B) *ex vivo* im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest bestimmt. Als Zielzellen wurden C57Bl6/SV Fibroblasten eingesetzt, die zwei Tage zuvor mit dem LCMV mit einer MOI von 0,01 infiziert wurden. {Gruppengrößen: TS2^{het}-neo-CD4Cre: n = 9; WT n = 6.}

4.1.3 LCMV-induzierte Expansion von T-Lymphozyten in TS2^{het}-neo-Mäusen

Nach Infektion mit dem LCMV proliferieren CD8⁺ T-Lymphozyten in Mäusen massiv mit zwei bis drei Zellteilungen pro Tag. Die absolute Anzahl der Milzzellen und der relative Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen sind somit wichtige Marker für die Stärke der Immunreaktion.

In TS2^{het}-neo- und WT Mäusen waren in Milzen an Tag 8 nach Infektion jeweils zwischen 1,5 und 2 x 10⁸ mononukleäre Zellen nachweisbar (Abb. 4A). In TS2^{het}-neo-Mäusen wie in WT Wurfgeschwistern waren ungefähr 45% dieser Milzzellen CD8⁺ T-Lymphozyten. Die CD4⁺ T-Lymphozyten machten in beiden Genotypen etwa 10% der Milzzellen aus (Abb. 4B). Somit hatte das Ca_v1.2mut-Transgen in TS2^{het}-neo-Mäusen keine Auswirkung auf die virusinduzierte Expansion von T-Lymphozyten.

In TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen mit potentiell gesteigerter Expression von Ca_v1.2mut in T-Zellen waren wie in korrespondierenden WT Mäusen etwa 1,5 bis 2 x 10⁸ mononukleäre Zellen pro Milz detektierbar (Abb. 4C). Unabhängig vom Genotyp waren 45% der Milzzellen CD8⁺ T-Zellen und knapp 10% CD4⁺ T-Zellen (Abb. 4D). Auch in TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen wurde somit kein Effekt des Ca_v1.2mut-Transgens auf die Expansion von T-Zellen nach Infektion mit dem LCMV nachgewiesen.

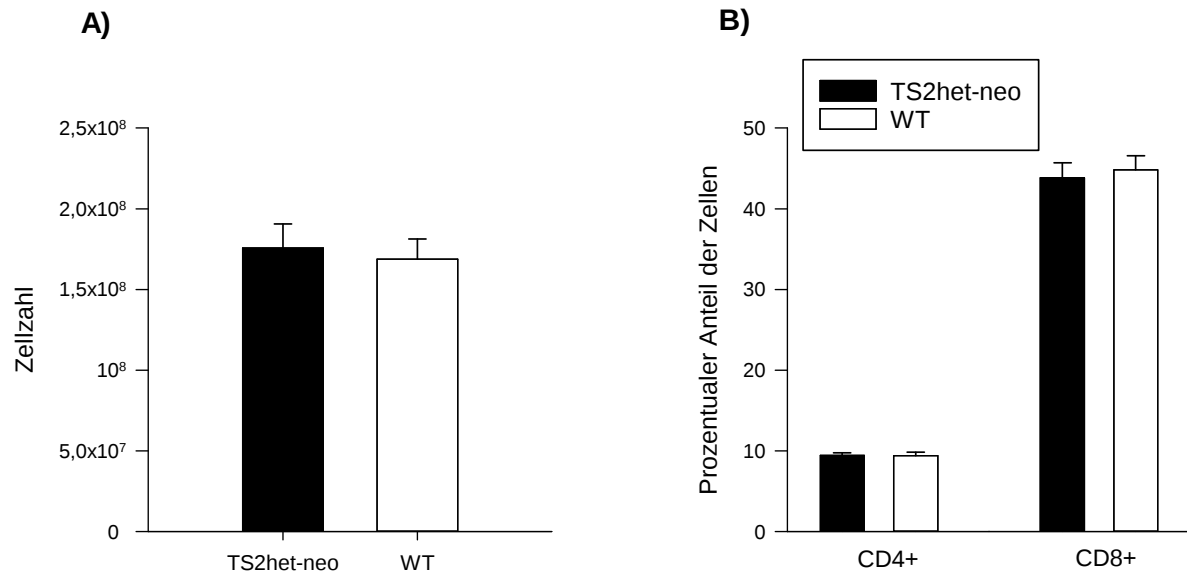
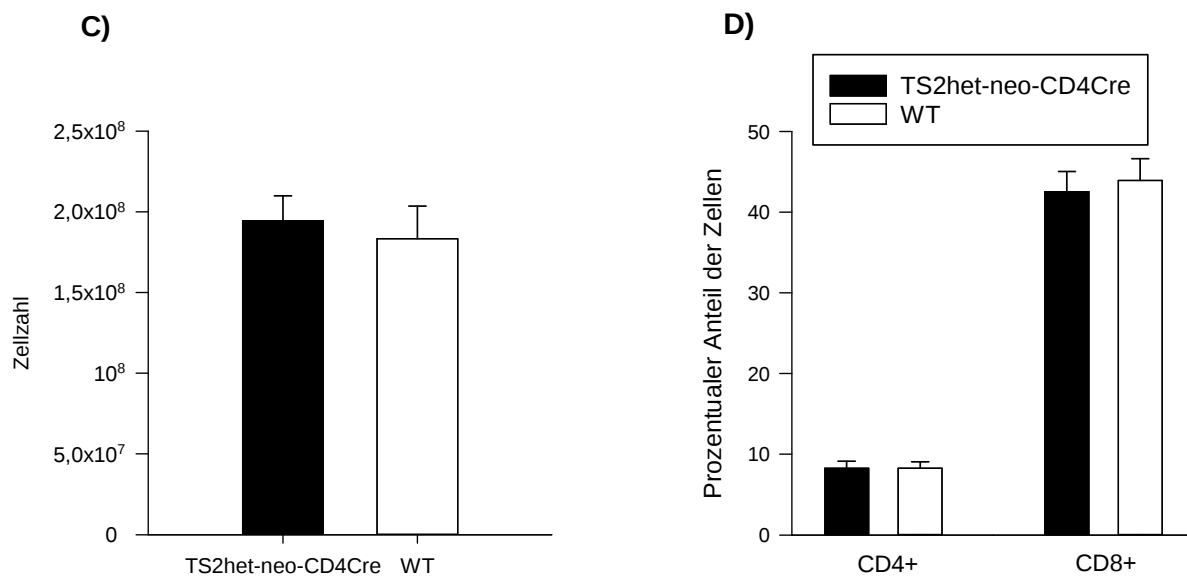
TS2-het-neo-MäuseTS2-het-neo-CD4-Cre-Mäuse

Abb. 4: Einfluss des Ca_v1.2^{mut}-Transgens auf die Expansion von T-Zellen in der Milz nach Infektion mit dem LCMV.

TS2^{het}-neo- (A, B) bzw. TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäuse (C, D) und ihre jeweiligen WT Wurfgeschwister wurden mit 10^5 I.E. des LCMV intravenös infiziert. An Tag 8 nach Infektion wurde aus der Milz die Zahl mononukleärer Zellen mit der Neubauer-Zählkammer (A, C) und die relativen Anteile CD4⁺ und CD8⁺ Zellen durchflusszytometrisch (B, D) bestimmt. {Gruppengrößen: A, B) TS2^{het}-neo: n = 17; WT: n = 19. C, D) TS2^{het}-neo-CD4Cre: n = 9; WT n = 7.}

4.1.4 LCMV-spezifische Antikörper in TS2^{het}-neo-Mäusen

Die Infektion mit 10^5 I.E. des LCMV induziert in WT Mäusen eine starke Aktivierung von B-Zellen mit folgender Produktion von spezifischen Antikörpern. In TS2^{het}-neo-Mäusen und WT Kontrollen lag der Titer für LCMV-spezifisches Immunglobulin M (IgM) an Tag 8 nach Infektion bei knapp 1:10.000. Der Titer für spezifisches Immunglobulin G (IgG) lag in beiden Genotypen an Tag 8 bei etwa 1:100.000 (Abb. 5).

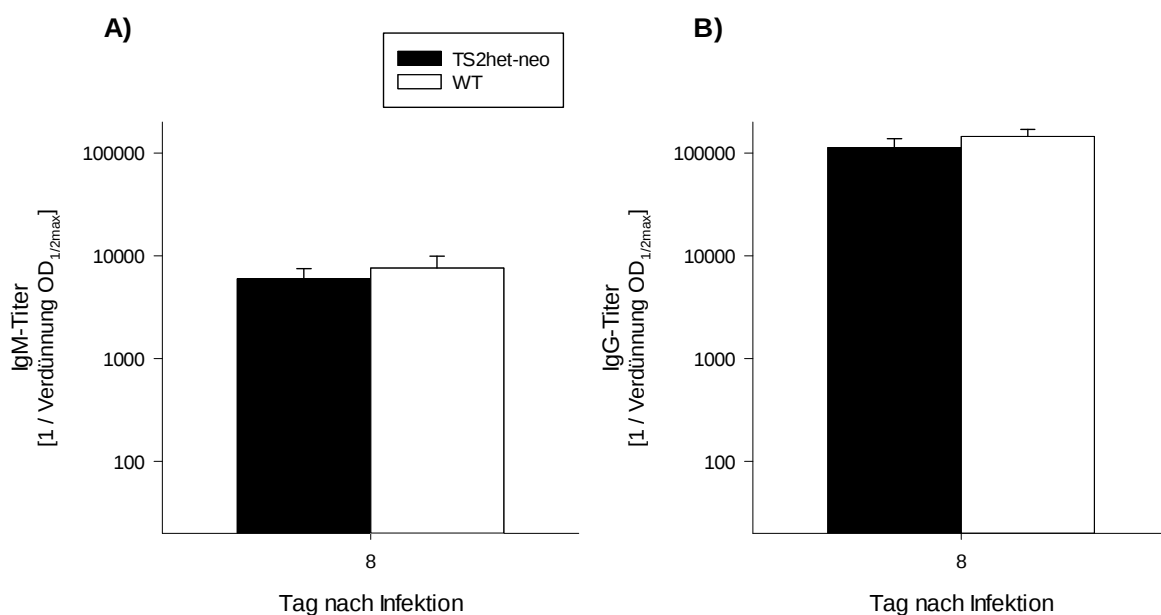


Abb. 5: LCMV-spezifische Antikörperantwort in TS2^{het}-neo-Mäusen an Tag 8 nach Infektion mit dem LCMV.

TS2^{het}-neo-Mäuse und WT Wurfgeschwister wurden mit 10^5 I.E. des LCMV intravenös infiziert. An Tag 8 nach Infektion wurden Serumproben entnommen. Die virusspezifischen IgM- (A) und IgG-Titer (B) wurden mit je einem ELISA als der Verdünnungsstufe mit halbmaximaler Optischer Dichte bestimmt. {Gruppengrößen: TS2^{het}-neo: n = 13; WT: n = 11.}

Für den Isotypenwechsel in Antikörper produzierenden B-Zellen von spezifischem IgM zu IgG ist die Helferaktivität von CD4⁺ T-Zellen notwendig [32, S. 400-401]. Um einen möglichen Effekt der Expression des Ca_v1.2mut in T-Zellen auf die LCMV-spezifische humorale Immunantwort aufzudecken, wurden deshalb TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäuse eingesetzt, in denen die Expression von Ca_v1.2mut in T-Zellen potentiell gesteigert ist.

In TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen und WT Kontrollen wurden Titer des LCMV-spezifischem IgM von 1:300 an Tag 4 detektiert. Der Titer stieg über Tag 6 kontinuierlich bis auf 1:5.500 an Tag 8 (Abb.6A). Der IgG-Titer lag an Tag 4 bei etwa 1:200 und an Tag 8 bei ungefähr 1:25.000 (Abb.6B). Zu den untersuchten Zeitpunkten waren die Titer der spezifischen IgM und IgG nach Infektion mit LCMV in TS-neo-CD4Cre-Mäusen und WT Kontrollen nahezu identisch. In der kritischen, frühen Phase der Infektion mit LCMV fand sich somit kein Hinweis für einen Einfluss des Ca_v1.2^{mut}-Transgens auf die Produktion und den Isotypenwechsel spezifischer Antikörper. Spätere Zeitpunkte wurden deshalb nicht analysiert.

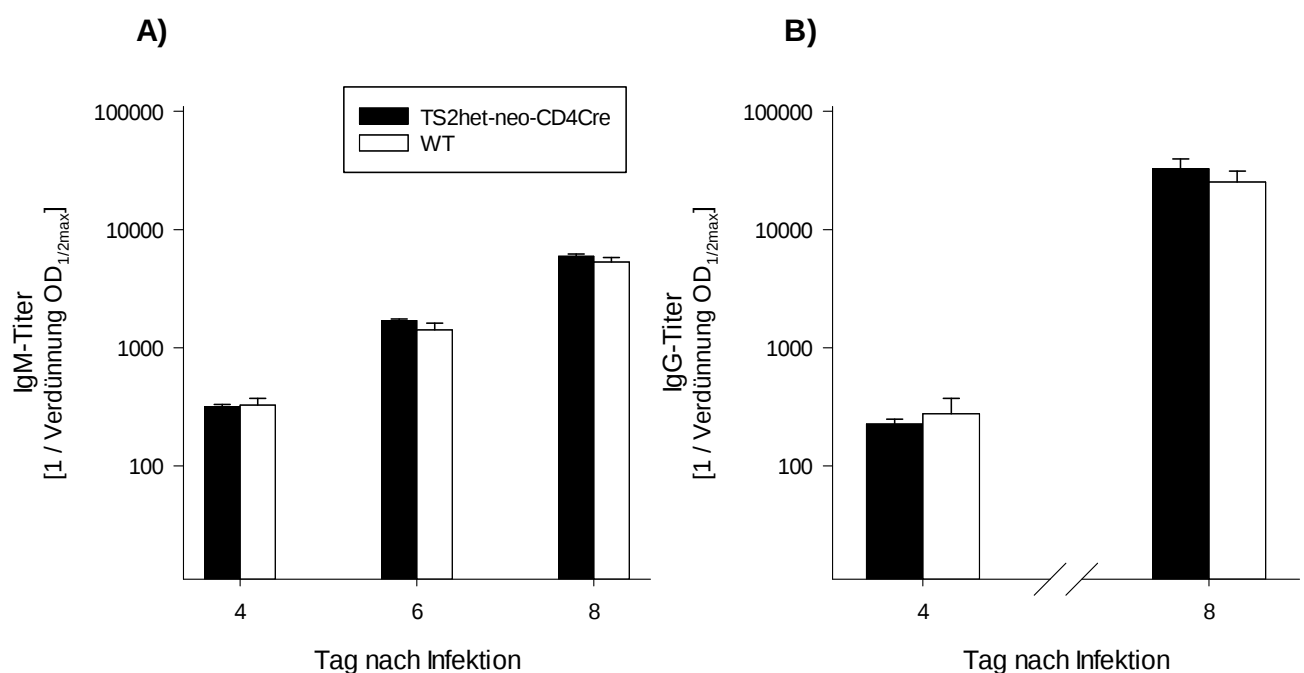


Abb. 6: Virusspezifische Antikörperproduktion in TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen nach Infektion mit dem LCMV

TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäuse und WT Wurfgeschwister wurden mit 10⁵ I.E. des LCMV intravenös infiziert. An den angegebenen Tagen wurden Serumproben genommen. Die virusspezifischen IgM- (A) und IgG-Titer (B) wurden mit je einem ELISA anhand der Verdünnungsstufe mit halbmaximaler Optischer Dichte bestimmt. {Gruppengrößen: TS2^{het}-neo-CD4Cre: n = 5; WT: n = 3.}

4.1.5 Einfluss von Nifedipin und Bay K8644 als Modulatoren an L-Typ Calciumkanälen auf die LCMV-spezifische zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen aus WT und TS2^{het}-neo-Mäusen

In TS2^{het}-neo-Mäusen wurde mit den obigen Experimenten kein Einfluss des Ca_v1.2^{mut}-Transgens auf die zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen gefunden. Ca_v1.2 gehört zu der Familie der L-Typ Calciumkanäle. Hierzu zählen auch Ca_v1.1 und Ca_v1.4, deren Expression in CD8⁺ Zellen beschrieben wurde [36]. Neben dem Einsatz transgener Mäuse mit der spezifischen Ca_v1.2-aktivierenden Timothy-2-neo-Mutation wird in dieser Arbeit durch die Verwendung kanalmodulierender Substanzen vom Dihydropyridintyp der Blick auch auf die gesamte Familie der L-Typ Calciumkanäle gerichtet.

Dihydropyridine modulieren selektiv L-Typ-Calciumkanäle [31]. Ein klinisch häufig eingesetztes Dihydropyridin ist Nifedipin. Es verringert die Öffnungswahrscheinlichkeit der L-Typ Calciumkanäle [44]. WT CD8⁺ T-Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Nifedipin behandelt, um etwaige Effekte der verringerten Öffnungswahrscheinlichkeit der L-Typ Kanäle auf die LCMV-spezifische zytolytische Aktivität von CD8⁺-Zellen nachzuweisen.

Unter Inkubation mit 10 µM Nifedipin erreichten CD8⁺ T-Zellen an Tag 8 nach Infektion mit LCMV bei einer E/T-Ratio von 100:1 eine Zytolyse von knapp 25% im Vergleich zu fast 40% Lyse durch unbehandelte CD8⁺ T-Zellen. Bei Inkubation mit 100 µM Nifedipin sank die Lyse weiter auf unter 20% bei einer E/T-Ratio von 100:1 (Abb. 7A).

Um den Unterschied der Lyseaktivität durch mit Nifedipin behandelte und unbehandelte CD8⁺ Zellen quantitativ vergleichen zu können, wurde wie folgt vorgegangen: Auf der y-Achse des Graphen wurde ein Lysewert gewählt, der sowohl durch behandelte als auch durch unbehandelte CD8⁺ Zellen erreicht wurde. Eine spezifische Lyse von 15% wurde durch unbehandelte CD8⁺ Zellen bei einer E/T-Ratio von ungefähr 30:1 erreicht. CD8⁺ Zellen, die mit 10 µM Nifedipin behandelt wurden, erreichten diesen Lysewert bei einer E/T-Ratio von etwa 45:1. Bei CD8⁺ Zellen, die mit 100 µM Nifedipin behandelt wurden, war hingegen eine E/T-Ratio von circa 60:1 notwendig, um die gleiche Lyse zu erreichen. Die Behandlung mit Nifedipin erhöhte die notwendige E/T-Ratio also bei 10 µM um den Faktor 1,5 und bei 100 µM um den Faktor 2. Die Inkubation mit Nifedipin verringerte somit die virusspezifische zytotoxische Aktivität von CD8⁺ Zellen dosisabhängig. Ob es sich bei den beobachteten Ergebnissen um Nifedipin-spezifische oder unspezifische, eventuell sogar toxische Effekte handelt, wird in der Diskussion angesprochen werden.

Die kanalmodulierende Substanz vom Dihydropyridintyp Bay K8644 erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit der L-Typ Calciumkanäle [42]. In der Literatur werden für Bay K8644 Konzentrationsbereiche von 25 nM bis zu 10 μ M angegeben [10, 22]. Unter Wirkung von 10 μ M Bay K8644 lysierten WT CD8⁺ T-Zellen infizierte Zielzellen genauso effektiv wie unbehandelte Kontrollen (Abb. 7A). Bay K8644 hat somit keine Auswirkung auf die virusspezifische zytotoxische Aktivität von T-Zellen.

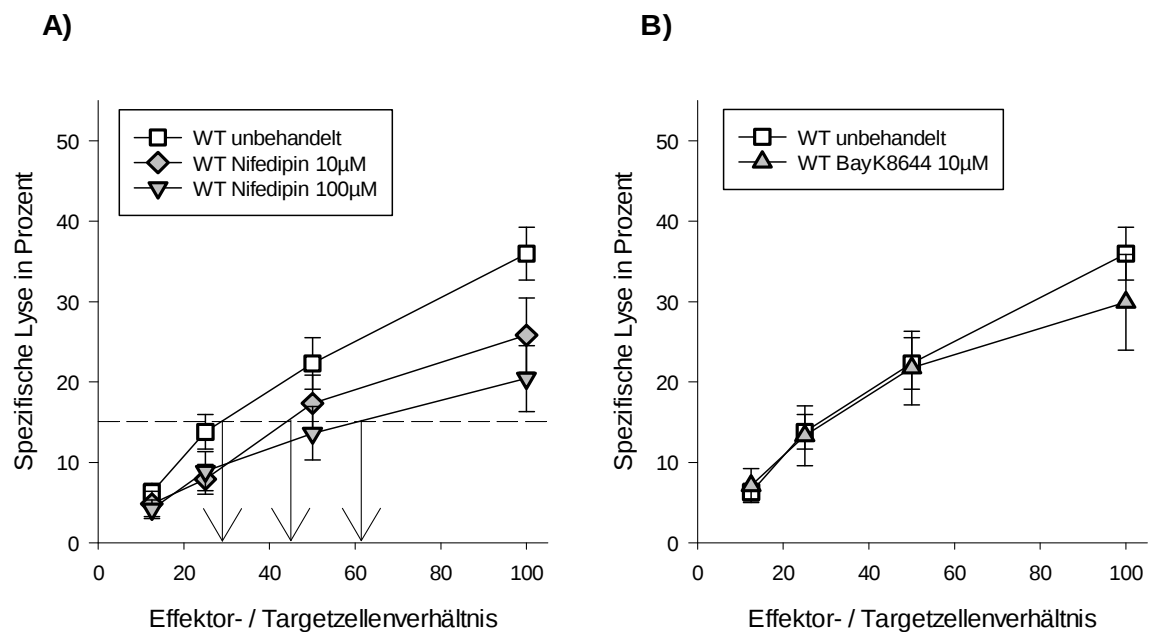


Abb. 7: Die LCMV-spezifische zytotoxische Aktivität von WT CD8⁺ Zellen unter Behandlung mit Nifedipin und Bay K8644.

WT Mäuse wurden mit 10⁵ I.E. des LCMV intravenös infiziert. An Tag 8 nach Infektion wurde die zytotoxische Aktivität von angereicherten CD8⁺ T-Zellen *ex vivo* im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest bestimmt. Die CD8⁺ T-Zellen wurden eine Stunde vor und während des ⁵¹Chrom-Freisetzungstests mit den angegebenen Dosen Nifedipin (A) oder Bay K8644 (B) behandelt. Als Zielzellen wurden C57Bl/SV Fibroblasten eingesetzt, die zwei Tage zuvor mit dem LCMV mit einer MOI von 0,01 infiziert wurden. {Kumulierte Daten aus 5 Experimenten mit insgesamt 8 WT Mäusen.}

Unter Behandlung mit Nifedipin ist die virusspezifische zytotoxische Aktivität von CD8⁺ Zellen aus WT Mäusen verringert. Die molekularbiologischen Veränderungen der TS2-Mutante des L-Typ Calciumkanals Cav1.2 können das Ansprechen des Kanals auf die Behandlung mit Nifedipin verändern [39]. Deswegen wurde in dieser Arbeit auch die virusspezifische zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen aus den transgenen TS2^{het}-neo-Mäusen unter Behandlung mit den kanalmodulierenden Substanzen Nifedipin und Bay K8644 untersucht.

Bei CD8⁺ T-Zellen aus TS2^{het}-neo-Mäusen wurde die virusspezifische zytotoxische Aktivität durch Behandlung mit 10 µM Nifedipin im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen nicht beeinflusst. Die Lyse betrug etwa 40% bei einer E/T-Ratio von 100:1. Unter 100 µM Nifedipin sank die zytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen auf etwa 25% bei einer E/T-Ratio von 100:1 (Abb. 8A). Die notwendige E/T-Ratio zum Erreichen derselben Lyse wie durch unbehandelte CD8⁺-Zellen war durch Behandlung mit 100 µM Nifedipin um den Faktor 2,5 erhöht. Die Behandlung mit 10 µM Bay K8644 hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die virusspezifische zytotoxische Aktivität von CD8⁺-Zellen aus TS2^{het}-neo-Mäusen (Abb.8B).

Die Wirkung von Nifedipin auf die LCMV-spezifische zytotoxische Aktivität durch CD8⁺ T-Zellen aus TS2^{het}-neo-Mäusen schien somit erst in einer höheren Konzentration einzusetzen als bei WT CD8⁺ Zellen. Für Bay K8644 wurde kein Einfluss auf die virusspezifische zytotoxische Aktivität durch CD8⁺ Zellen aus TS2^{het}-neo-Mäusen nachgewiesen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten für diesen Versuch nur wenige Mäuse eingesetzt werden. Die Streuung der Messdaten ist deshalb noch groß. Es ist geplant, die Datenbasis durch Wiederholung mit weiteren Mäusen zu stabilisieren.

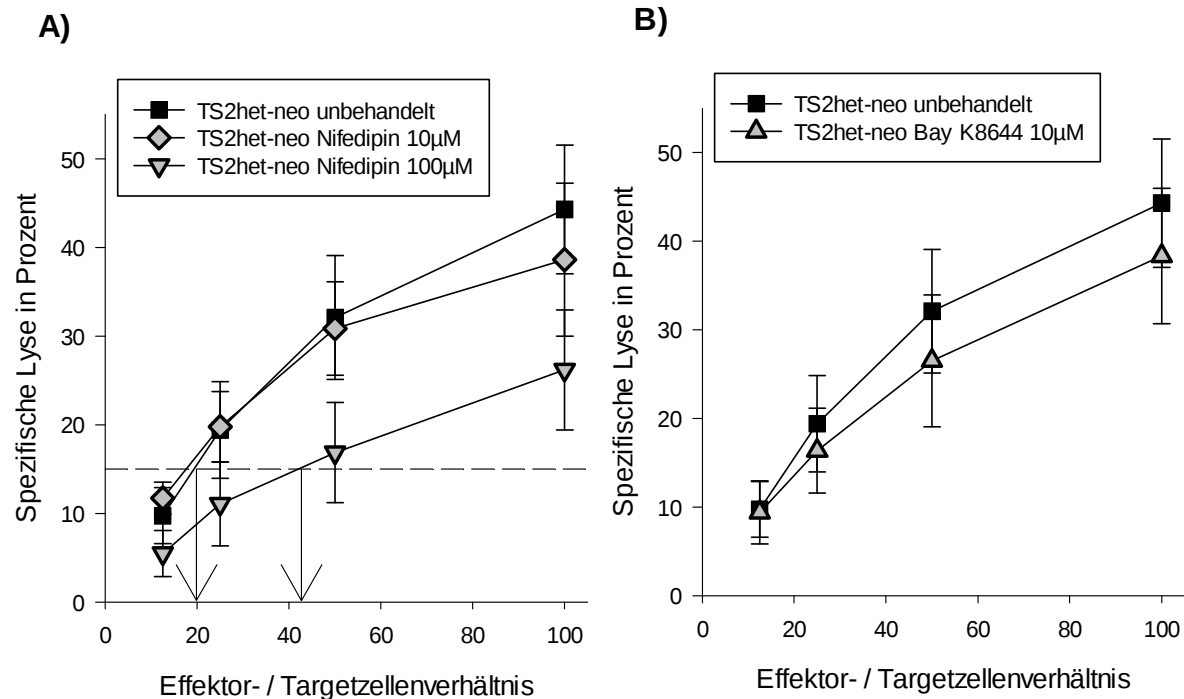


Abb. 8: Virusspezifische Zytotoxizität von CD8⁺ Zellen aus TS2^{het}-neo-Mäusen unter Behandlung mit Nifedipin und Bay K8644.

TS2^{het}-neo-Mäuse wurden mit 10⁵ I.E. des LCMV intravenös infiziert. An Tag 8 nach Infektion wurde die zytotoxische Aktivität von angereicherten CD8⁺ T-Zellen *ex vivo* im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest bestimmt. Die CD8⁺ T-Zellen wurden eine Stunde vor und während des ⁵¹Chrom-Freisetzungstests mit den angegebenen Dosen Nifedipin (A) oder Bay K8644 (B) behandelt. Als Zielzellen wurden C57Bl/SV Fibroblasten eingesetzt, die zwei Tage zuvor mit dem LCMV mit einer MOI von 0,01 infiziert wurden. {Kumulierte Daten aus 2 Experimenten mit insgesamt 3 TS2^{het}-neo-Mäusen.}

Zusammenfassend zeigen sich im Verlauf der akuten Infektion mit dem LCMV weder bei der Viruslast und -elimination, der LCMV-spezifischen Zytotoxizität, der Expansion von T-Lymphozyten noch bei der Generierung LCMV-spezifischer Antikörper Effekte des Cav1.2mut-Transgens auf die virusspezifische Immunantwort.

Die Behandlung mit Nifedipin als Modulator an L-Typ Calciumkanälen senkte hingegen die virusspezifische zytotoxische Aktivität von CD8⁺ Zellen dosisabhängig. Die Senkung war in WT Zellen etwas stärker als in Zellen aus TS2^{het}-neo Mäusen ausgeprägt. Die Behandlung mit Bay K8644 hatte keinen Einfluss auf die virusspezifische Zytotoxizität von CD8⁺ Zellen.

4.2 Einfluss des Cav1.2 auf den Verlauf der Infektion mit *Listeria monocytogenes*

4.2.1 Überleben von TS2^{het}-neo-MxCre- und TS2^{het}-neo-LysMCre- Mäusen nach Infektion mit *L. monocytogenes*

Zur Untersuchung des Phänotyps von Mäusen mit Timothy-2-Syndrom standen neben Mäusen mit zelltypspezifisch erhöhter Expression des Cav1.2-Transgens auch TS2^{het}-neo-Mx1Cre-Mäuse zur Verfügung, bei denen eine induzierbare Erhöhung der Expression von Cav1.2^{mut} im Gesamtorganismus erreicht werden kann. Die Expression der Cre-Rekombinase wird in diesen Mäusen durch den Interferon-responsiven Genpromotor Mx1 reguliert [26]. Zu einer massiven Ausschüttung von Typ 1 Interferon kommt es in der frühen Infektion mit *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) [15]. So wird im Verlauf der Infektion mit *L. monocytogenes* über Mx1 die Cre-Rekombinase in allen Zellen exprimiert, die mit Typ 1 Interferon in Kontakt kommen. Hierzu zählen insbesondere auch die Zellen des Immunsystems, in denen dann die Expression von Cav1.2^{mut} potentiell gesteigert wird.

TS2^{het}-neo-Mx1-Cre und WT Mäuse wurden intraperitoneal mit 5×10^4 Kolonie bildenden Einheiten (colony-forming units, CFU) *L. monocytogenes* infiziert. Nach Infektion mit *L. monocytogenes* überlebten etwa 65% der TS2^{het}-neo-Mx1Cre-Mäuse. Von den WT Wurfgeschwistern überlebten hingegen nur 40% der Tiere (Abb. 9A). Aus vorigen Projekten der Gruppe Utermöhlen ist bekannt, dass bei der eingesetzten Dosis von 5×10^4 CFU *L. monocytogenes* etwa 50% der WT Mäuse überleben (LD 50). Bei Einsatz einer Infektionsdosis dieser Größenordnung können Unterschiede im Überleben sehr sensitiv aufgedeckt werden. Der Überlebensvorteil für TS2^{het}-neo-Mx1Cre-Mäuse von 25 Prozentpunkten gegenüber WT Kontrollen erreicht trotz der noch relativ kleinen Gruppengröße von 15 TS2^{het}-neo-Mx1Cre-Mäusen bei mehr als 30 WT Kontrollen bereits ein Signifikanzniveau von $p=0,13$. Dies ist ein Hinweis auf einen möglichen Effekt des Cav1.2^{mut}-Transgens auf den Verlauf der Infektion mit *L. monocytogenes*.

Die Überlebenskurven von TS2^{het}-neo-Mx1Cre- und WT Mäusen nach Infektion mit *L. monocytogenes* trennen sich bereits nach 5 Tagen. In den ersten Tagen nach Infektion mit *L. monocytogenes* sind vor allem neutrophile Granulozyten und Makrophagen für die antibakterielle Abwehr verantwortlich [43]. Um die Rolle des Cav1.2^{mut} in myeloiden Zellen der Granulozyten- und Makropagenlinie zu untersuchen, wurden TS2^{het}-neo-LysMCre-Mäuse eingesetzt. In diesen Mäusen wird die Expression der Cre-Rekombinase, die die invertierte Neomycin-Kassette vor der kodierenden

Sequenz des $Ca_v1.2^{mut}$ entfernt, durch den Promotor des für Granulozyten und Makrophagen zelltypspezifischen Gens *LysM* kontrolliert [12].

Nach Infektion mit 5×10^4 CFU *L. monocytogenes* überlebten 50% der $TS2^{het}$ -neo-LysMCre-Mäuse, während alle WT Mäuse bis Tag 8 starben (Abb. 9B). Im Rahmen dieser Arbeit konnten für die Beobachtung des Überlebens nach Infektion mit *L. monocytogenes* nur sechs $TS2^{het}$ -neo-LysMCre- und vier WT Mäuse in einem Experiment eingesetzt werden. Eine Stabilisierung dieser Befunde durch Wiederholung der Versuche mit weiteren $TS2^{het}$ -neo-LysMCre-Mäusen ist deswegen in der Arbeitsgruppe geplant.

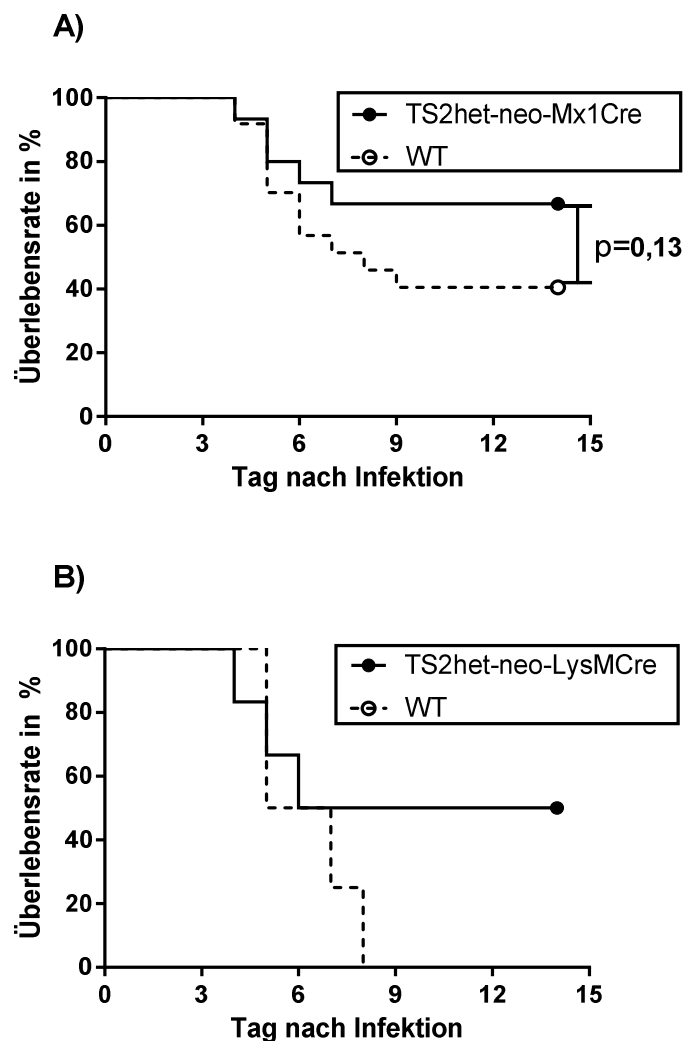


Abb. 9: Auswirkung des $Ca_v1.2^{mut}$ -Transgens auf die Überlebensrate von induzierbaren $TS2^{het}$ -neo-Mx1Cre- und zelltypspezifischen $TS2^{het}$ -neo-LysMCre-Mäusen nach Infektion mit *L. monocytogenes*

Induzierbare $TS2^{het}$ -neo-Mx1Cre-Mäuse (A) bzw. spezifisch für Zellen der myeloiden Reihe $Ca_v1.2$ transgene $TS2^{het}$ -neo-LysMCre-Mäuse (B) und ihre jeweiligen WT Wurfgeschwister wurden mit 5×10^4 CFU *L. monocytogenes* infiziert. Der Zustand der Mäuse wurde initial täglich und später viermal täglich überwacht. {Gruppengrößen: A) $TS2^{het}$ -neo-Mx1Cre: n = 15; WT: n = 37. B) $TS2^{het}$ -neo-LysMCre: n = 6; WT: n = 4.}

4.2.2 Kontrolle der Bakterienlast von *L. monocytogenes* in TS2^{het}-neo-Mäusen

Die Effektivität der Kontrolle von *L. monocytogenes* wurde anhand der Bakterienlast in Milz und Leber beurteilt. An Tag 2 nach Infektion waren in Milzen von TS2^{het}-neo- und WT Mäusen etwa 10^7 CFU/g nachweisbar. Bis Tag 3 sank die Bakterienlast in beiden Genotypen auf jeweils etwa 10^5 CFU/g Listerien (Abb. 10A). In Lebern von TS2^{het}-neo-Mäusen waren an Tag 2 nach Infektion circa 10^6 CFU/g und bei WT Kontrollen ungefähr 10^4 CFU/g nachweisbar. Dieser scheinbar beeindruckende Unterschied wird durch die bisher untersuchte Gruppengröße von lediglich 2 Mäusen pro Genotyp relativiert. An Tag 3 betrug die Bakterienlast in Lebern aus TS2^{het}-neo- und WT Mäusen je 10^4 CFU/g (Abb. 10B).

Da an allen Tagen für jeden Genotyp bisher nur zwei Mäuse eingesetzt wurden und die Bakterienlast nach Infektion mit *L. monocytogenes* erfahrungsgemäß stark variiert, ist eine Interpretation dieser Daten schwierig. In Zusammenschau der Befunde scheint jedoch keine starke Wirkung des Cav1.2-Transgens auf die Kontrolle von *L. monocytogenes* zu bestehen. Um die Datenbasis zu verbreitern und etwaige geringfügige Effekte des Cav1.2-Transgens nachzuweisen, ist eine Wiederholung des Versuchs in der Arbeitsgruppe für die nahe Zukunft geplant.

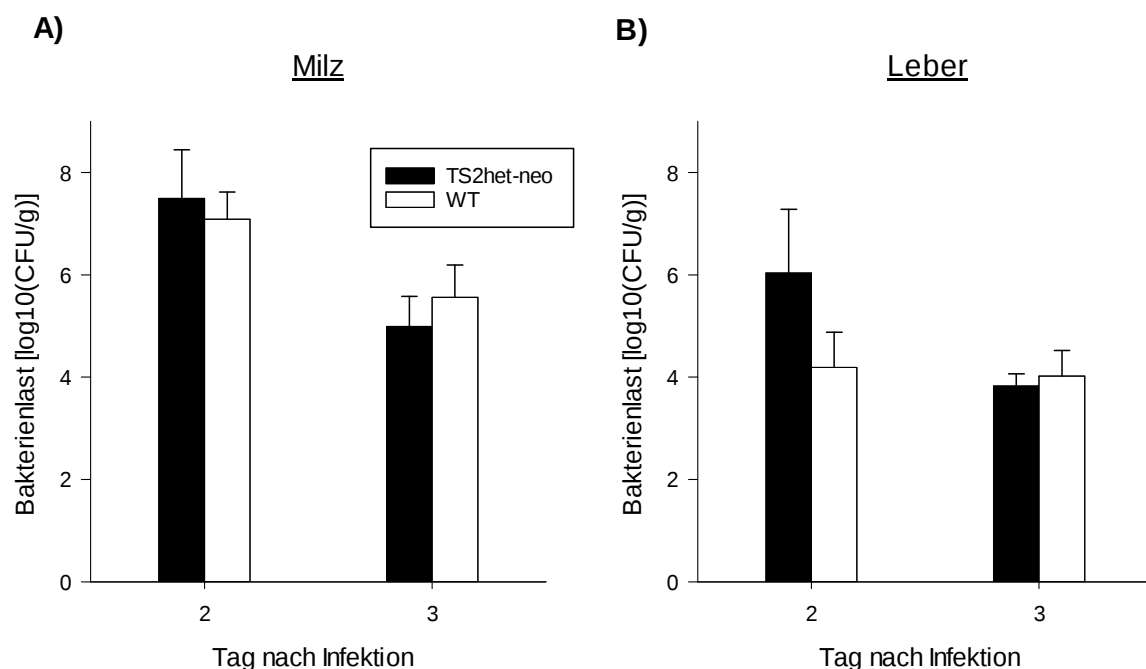


Abb. 10: Bakterienlast in TS2^{het}-neo-Mäusen an den frühen Tagen nach Infektion mit *L. monocytogenes*.

TS2^{het}-neo-Mäuse und WT Wurfgeschwister wurden mit 5×10^4 CFU *L. monocytogenes* infiziert. In Milz- (A) und Leberhomogenisaten (B) der Mäuse wurde an den Tagen 2 und 3 nach Infektion die Bakterienlast durch Ausplattierung auf Blutagarplatten bestimmt. {Gruppengrößen: 2 TS2^{het}-neo- und 2 WT Mäuse pro Tag.}

4.2.3 Rekrutierung myeloider Zellen in die Peritonealhöhle von TS2^{het}-neo-Mäusen nach Infektion mit *L. monocytogenes*

An den ersten Tagen nach Infektion mit *L. monocytogenes* werden verschiedene Zelltypen des Immunsystems in WT Mäusen in einer gut untersuchten Sequenz aktiviert [16]. Die Aktivierung ist zum Beispiel anhand der Rekrutierung von Immunzellen in definierte Kompartimente des Organismus zu verfolgen. In die Peritonealhöhle werden in den ersten Tagen vor allem Granulozyten und Makrophagen rekrutiert. Die absolute Anzahl aller Zellen in der Peritoneallavage sowie die relativen Anteile von Subpopulationen sind Marker für die geordnete Abfolge und Stärke der Immunantwort gegen *L. monocytogenes*.

In TS2^{het}-neo- und WT Mäusen waren an Tag 2 nach Infektion etwa 2×10^6 Leukozyten in der Peritoneallavage nachweisbar (Abb. 11A). Davon exprimierten etwa 50% der Zellen gleichzeitig CD11b und F4/80, die bei Koexpression auf der Zelloberfläche als spezifische Marker für Makrophagen angesehen werden (Abb. 11B). Weitere 50% exprimierten den Granulozyten-Marker Gr1 (Abb. 11C). An Tag 3 waren in der Peritoneallavage von TS2^{het}-neo und WT Mäusen etwa 5×10^6 Leukozyten nachweisbar. Davon waren unabhängig vom Genotyp etwa 50% CD11b⁺ / F4/80⁺ Makrophagen und 25% Gr1⁺ Granulozyten (Abb. 11). In der kritischen Frühphase der Infektion mit *L. monocytogenes* bestand folglich kein Einfluss des Ca_v1.2^{mut}-Transgens auf die Rekrutierung myeloider Zellen in das Peritoneum von TS2^{het}-neo-Mäusen.

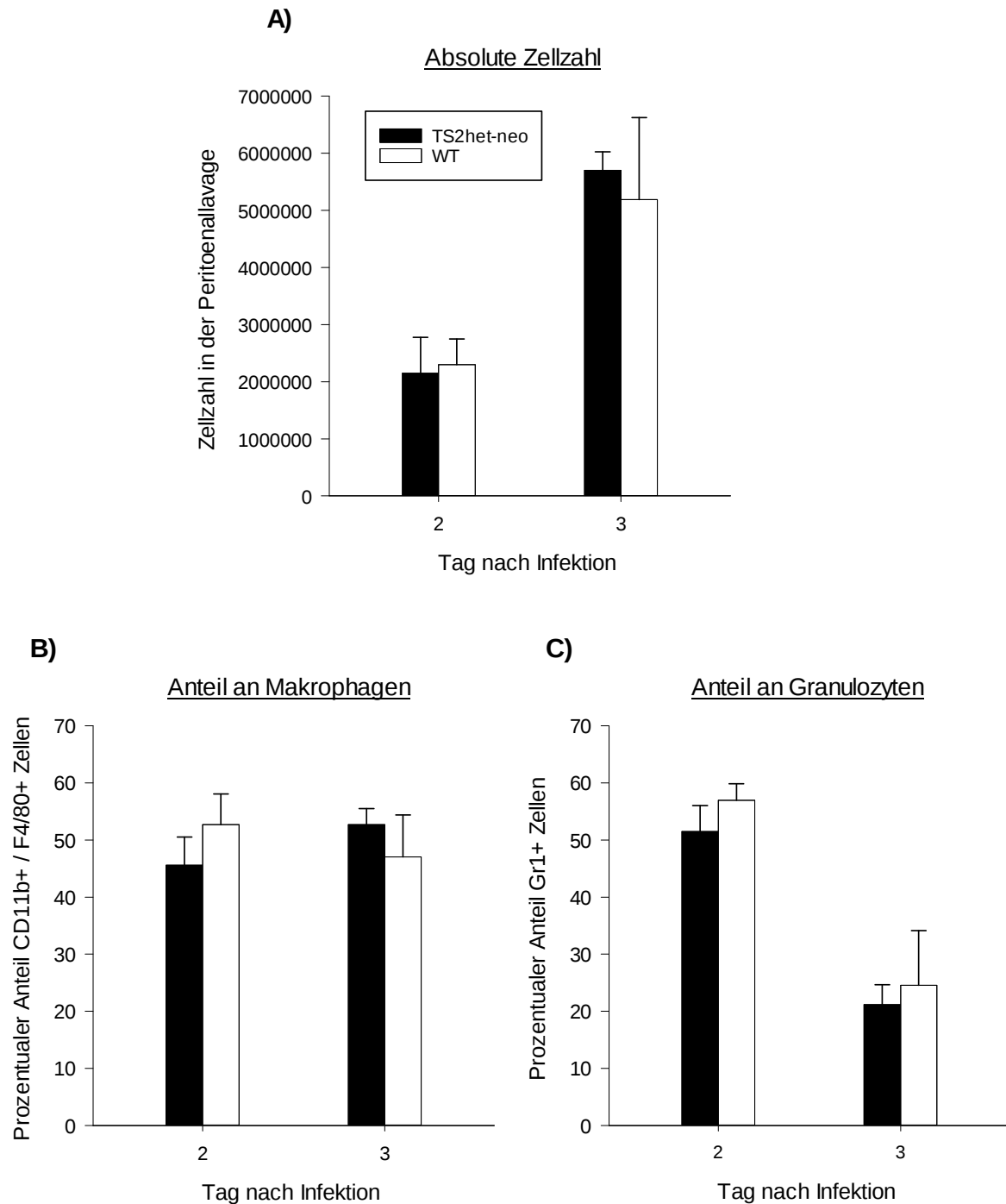


Abb. 11: Rekrutierung von myeloiden Zellen in die Peritonealhöhle an den frühen Tagen nach Infektion mit *L. monocytogenes*.

TS2^{het}-neo-Mäuse und WT Wurfgeschwister wurden mit 5×10^4 CFU *L. monocytogenes* infiziert. An den Tagen 2 und 3 nach Infektion wurden Zellen durch eine Peritoneallavage gewonnen. Die Zellzahl in der Lavage wurde in einer Neubauer-Kammer bestimmt (A). Die Zellen wurden durchflusszytometrisch auf Expression von Gr1 (B) sowie die Koexpression von CD11b und F4/80 (C) analysiert. {Gruppengröße: 2 TS2^{het}-neo- und 2 WT Mäuse pro Tag.}

4.3 Einfluss von Cav1.2 auf die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in CD11b⁺ myeloiden Zellen

4.3.1 Einfluss der TS2-Mutation auf die Basalproduktion von ROS durch CD11b⁺ Zellen

Die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) ist unter anderem vom intrazellulären Calciumspiegel abhängig [7]. Eine Auswirkung des Cav1.2 auf die Produktion von ROS liegt somit nahe. Insbesondere CD11b⁺ myeloide Zellen, wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen, produzieren ROS in großen Mengen [32, S. 80-82]. Für die Untersuchung der basalen ROS-Produktion wurden deshalb TS2^{het}-neo-LysMCre-Mäuse mit potentiell gesteigerter Expression des Cav1.2mut in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen eingesetzt.

Die Basisproduktion intrazellulärer ROS stieg in CD11b⁺ Zellen aus naiven TS2^{het}-neo-LysMCre- und WT Mäusen ohne Stimulus langsam bis zu einem Wert von ungefähr 3000 relativen Fluoreszenzeinheiten (relative fluorescence unit, RFU) an (Abb. 12A). Dieser Verlauf ist typisch für das gewählte Nachweisverfahren. Auf die basale Generierung intrazellulärer ROS hatte das Cav1.2mut-Transgen somit keine Auswirkung.

Die spontane Produktion extrazellulärer ROS durch CD11b⁺ Zellen aus TS2^{het}-neo-LysMCre-Mäusen und WT Mäusen blieb dauerhaft auf niedrigem Niveau zwischen etwa 500 bis 2000 relativen Lumineszenzeinheiten (relative luminescence units, RLU) (Abb. 12B).

Es wurden somit keine Auswirkungen des Cav1.2mut-Transgens auf die spontane Basalproduktion intra- oder extrazellulärer ROS in naiven CD11b⁺ Zellen nachgewiesen.

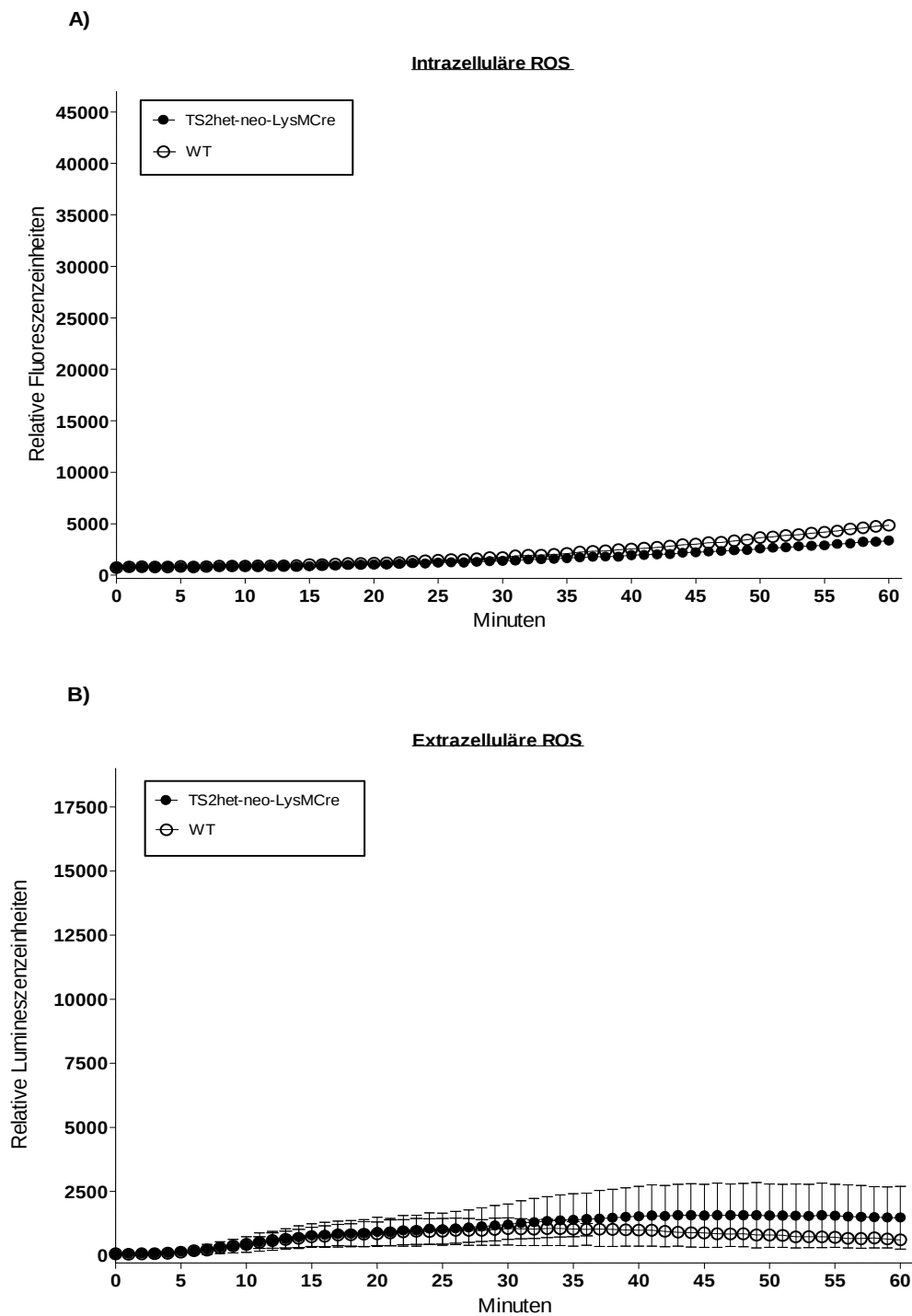


Abb. 12: Einfluss des CaV1.2mut-Transgens auf die Basalproduktion intra- und extrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies durch CD11b⁺ myeloide Zellen.

CD11b⁺ Zellen aus der Peritoneallavage von TS2^{het}-neo-LysMCre-Mäusen und WT Wurfgeschwistern wurden ausplattiert. Nach Adhäsion der Zellen wurde die Generierung intrazellulärer ROS durch Fluoreszenz von DCF (A) und extrazellulärer ROS durch Lumineszenz von Isoluminol (B) im Zeitverlauf gemessen. {Datenbasis: A) Ein Experiment mit gepoolten Zellen aus 7 TS2^{het}-neo-LysMCre- und 6 WT Mäusen. B) Zwei Experimente mit gepoolten Zellen aus 12 TS2^{het}-neo-LysMCre und 12 WT Mäusen.}

4.3.2 Einfluss von Nifedipin und Bay K8644 auf die Produktion von ROS durch myeloide CD11b⁺ Zellen

In diesem Projekt wurde auch der Einfluss von Nifedipin und Bay K8644 auf die Generierung intra- und extrazellulärer ROS durch CD11b⁺ Zellen bestimmt. Durch Inkubation mit hitzeinaktivierten Listerien (heat-killed *Listeria monocytogenes*, HKLM) wurde die ROS-Produktion in WT CD11b⁺ Zellen stimuliert.

CD11b⁺ Zellen produzierten nach Stimulation mit HKLM ohne Zugabe von Pharmaka im Zeitverlauf von 60 min kontinuierlich ansteigende Mengen intrazellulärer ROS. In mit 10 µM Nifedipin behandelten CD11b⁺ Zellen wurden im Vergleich zu den Kontrollen zu allen Zeitpunkten ungefähr dreimal höhere Signale intrazellulärer ROS nachgewiesen (Abb. 13A). Die interindividuellen Schwankungen des gewählten Nachweisverfahrens sind erheblich, sodass bei den zwei durchgeführten Experimenten die Streubreite der Daten groß ist. Deutlich wird jedoch, dass die Behandlung mit 10 µM Nifedipin die Produktion intrazellulärer ROS durch CD11b⁺-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach Stimulation mit HKLM steigert.

Für extrazelluläre ROS wurde nach Stimulation mit HKLM bei mit Nifedipin behandelten CD11b⁺ Zellen ungefähr die halbe Signalintensität im Vergleich zu unbehandelten CD11b⁺ Zellen nachgewiesen (Abb. 13B).

Die Inkubation mit Nifedipin steigerte nach Stimulation mit HKLM also die Generierung intrazellulärer ROS und senkte die Generierung extrazellulärer ROS durch WT CD11b⁺ Zellen.

Sowohl unbehandelte als auch mit 10 µM Bay K 8644 behandelte CD11b⁺ Zellen produzierten nach Stimulation mit HKLM über den Zeitraum des gewählten Nachweisverfahrens kontinuierlich mehr ROS (Abb. 14A). Zu allen Zeitpunkten lag die ROS-Produktion durch mit Bay K8644 und unbehandelte CD11b⁺ Zellen dabei in etwa dem gleichen Korridor.

Die Signalintensität für extrazelluläre ROS nach Stimulation mit HKLM war durch Behandlung von CD11b⁺ Zellen mit Bay K8644 im Vergleich zur ROS-Produktion durch unbehandelte CD11b⁺ Zellen um etwa 40% verringert (Abb. 14B).

Die Inkubation von WT CD11b⁺ Zellen mit Bay K8644 hatte also keinen Effekt auf die Produktion intrazellulärer ROS und senkte die Produktion extrazellulärer ROS nach Provokation mit HKLM.

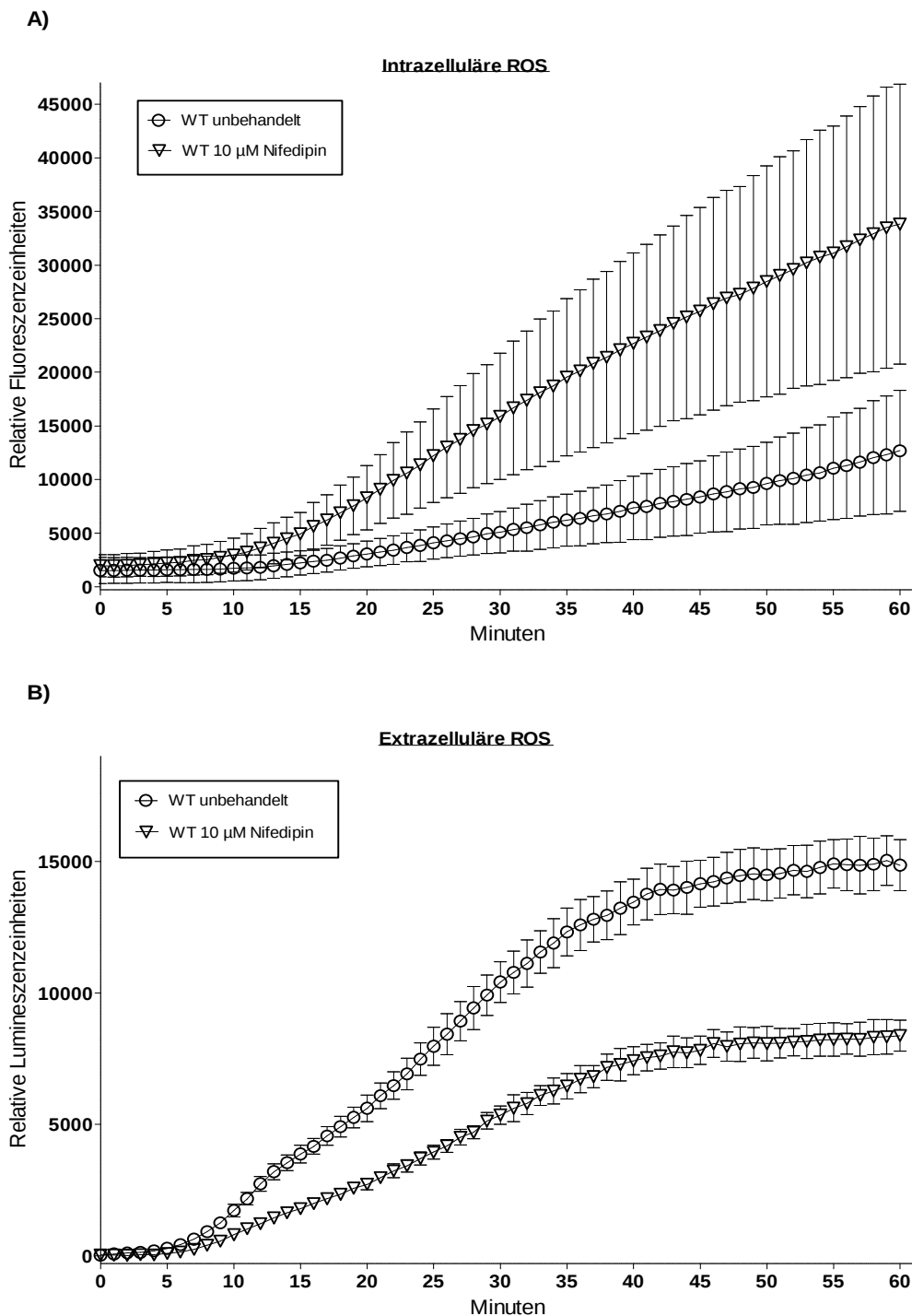


Abb. 13: Auswirkung von Nifedipin auf die HKLM-stimulierte Produktion von ROS durch WT CD11b⁺ myeloide Zellen.

CD11b⁺ Zellen aus der Peritoneallavage von WT Mäusen wurden ausplattiert. Nach Adhäsion wurden die Zellen mit hitzeinaktivierten Listerien stimuliert und mit 10 µM Nifedipin behandelt oder unbehandelt belassen. Es wurde über den zeitlichen Verlauf die Generierung intrazellulärer ROS durch Fluoreszenz von DCF (A) und extrazellulärer ROS durch Lumineszenz von Isoluminol (B) gemessen. {Datenbasis: A) Zwei Experimente mit gepoolten Zellen aus 12 WT Mäusen. B) Ein Experiment mit gepoolten Zellen aus 6 WT Mäusen.}

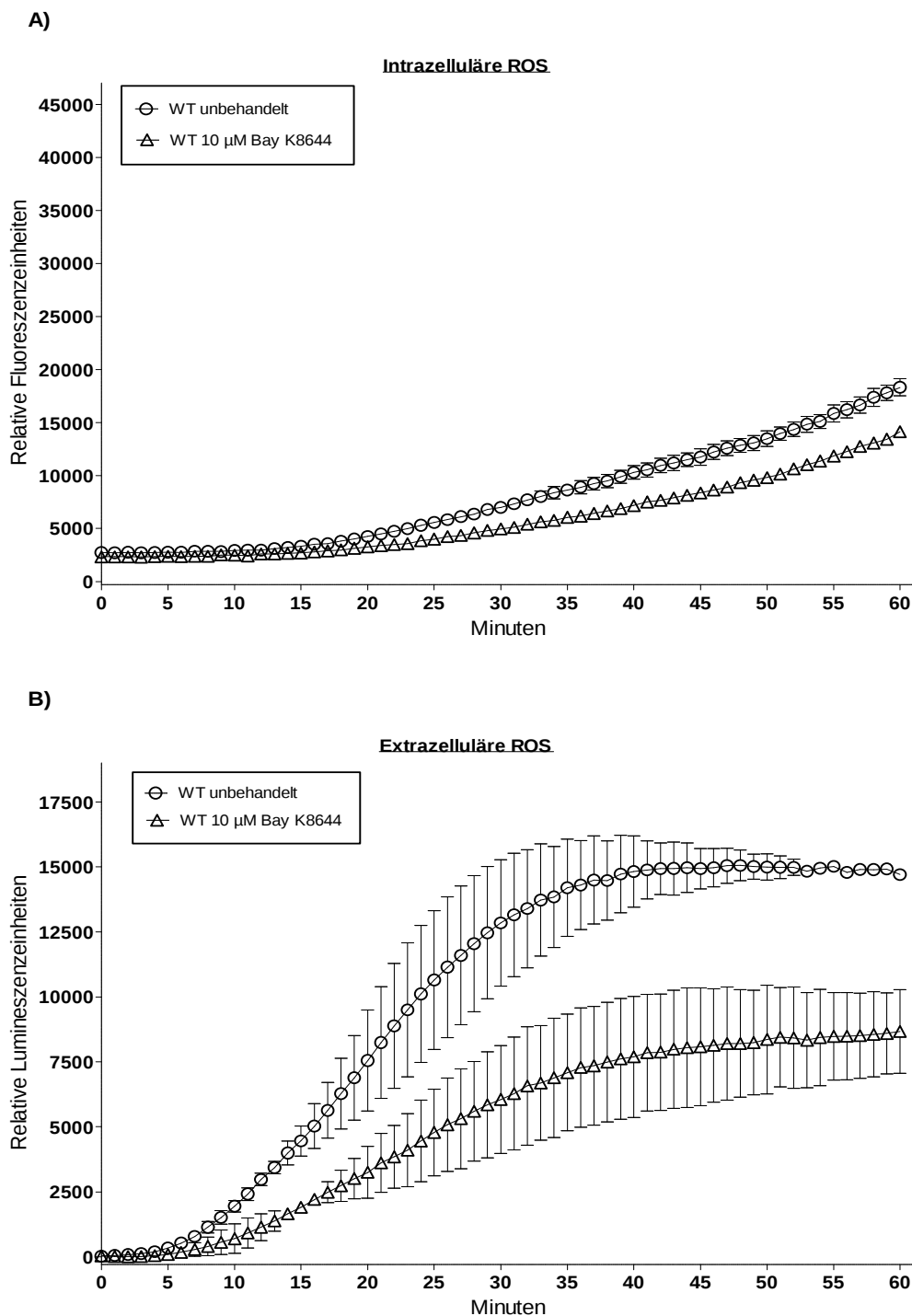


Abb. 14: Wirkung von Bay K8644 auf die Produktion von ROS durch mit HKLM stimulierte CD11b⁺ myeloide Zellen.

CD11b⁺ Zellen aus der Peritoneallavage von WT Mäusen wurden ausplattiert. Nach Adhäsion wurden die Zellen mit hitzeinaktivierten Listerien stimuliert und mit 10 µM Bay K8644 behandelt oder unbehandelt belassen. Es wurde über den zeitlichen Verlauf die Generierung intrazellulärer ROS durch Fluoreszenz von DCF (A) und extrazellulärer ROS durch Lumineszenz von Isoluminol (B) gemessen. {Datenbasis: A) Ein Experiment mit gepoolten Zellen aus 6 WT Mäusen. B) Zwei Experimente mit gepoolten Zellen aus 12 WT Mäusen.

4.4 Effekt des Cav1.2mut-Transgens in einem murinen Allergiemodell

Für die Sensibilisierung gegen Allergene bei Typ-I-Allergien ist die Aktivität von Typ-2-T-Helferzellen (T_{H2}-Zellen) notwendig [32, S. 592]. Die Arbeitsgruppe Pelletier hat gezeigt, dass diese T_{H2}-Zellen Cav1.2 exprimieren und dass die Behandlung von Mäusen mit Cav1.2-Antisense-RNA in einem Allergiemodell zu einer verringerten bronchialen Hyperreaktivität führt [9, 19].

Mit diesem Projektteil wurde untersucht, wie sich die Cav1.2-aktivierende Timothy-2-Mutation auf die bronchiale Hyperreaktivität gegen das Modellantigen Ovalbumin auswirkt. Um gezielt in T_{H2}-Zellen die Expression des Cav1.2mut zu steigern, wurden TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäuse eingesetzt.

Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von Ovalbumin sensibilisiert. Zwei Wochen später wurden sie durch fünfmalige intranasale Applikation von Ovalbumin an aufeinanderfolgenden Tagen mit dem Allergen belastet, um eine allergische Entzündung im respiratorischen System auszulösen. Die Anzahl von Zellen in der Spülflüssigkeit der bronchoalveolären Lavage (BAL) ist ein Marker für die Stärke der Entzündung.

In TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen waren nach der letzten intranasalen Applikation jeweils etwa $1,5 \pm 0,2 \times 10^6$ Zellen in der Spülflüssigkeit nachweisbar. In der Spülflüssigkeit der BAL aus WT Kontrollen waren circa $1,2 \pm 0,2 \times 10^6$ (Abb. 15A). Die Entzündung in den TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen schien somit geringfügig stärker zu sein. Bei einer Gruppengröße von jeweils vier TS2^{het}-neo-CD4Cre- und WT Mäusen war die Streuung der Daten jedoch noch zu groß, um eine definitive Aussage zu erlauben. Eine Wiederholung dieses Experiments ist geplant.

Das Zytokin Interleukin 4 (IL 4) fördert die Differenzierung naiver T-Zellen zu Typ2-T-Helferzellen und trägt so zur Entstehung von Allergien bei [32, S. 574]. Die IL 4-Spiegel in der Spülflüssigkeit der BAL von TS2^{het}-neo-CD4Cre- und WT Mäusen nach der letzten intranasalen Applikation von Ovalbumin lagen bei ungefähr 14 pg/ml (Abb. 15B). Zytokine im Respirationstrakt der Maus verteilen sich im Flüssigkeitsfilm der Bronchien auf ein Volumen von wenigen Mikrolitern. Bei der BAL wird dieses Volumen durch die 3-5 ml Spülflüssigkeit stark verdünnt. Die nachgewiesenen Spiegel von 14 pg/ml IL 4 liegen dadurch nur knapp oberhalb der Sensitivitätsgrenze des verwendeten ELISA von etwa 10 pg/ml und lassen nur begrenzte Aussagen über die tatsächlichen IL 4-Spiegel zu. Für die Zukunft sind deswegen Experimente geplant, bei denen für die BAL geringere Volumina eingesetzt werden sollen, um die lokalen IL 4-Spiegeln zuverlässig zu bestimmen.

Bei Typ-I-Allergien löst die Bindung des Allergens an spezifisches Immunglobulin E (IgE), das an Fcε-Rezeptoren von Mastzellen gebunden ist, die allergische Reaktion aus [32, S. 574]. Zwischen dem an Fcε-Rezeptoren gebundenem und im Serum gelöstem IgE besteht ein Gleichgewicht. Der spezifische IgE-Serumtiter gegen Ovalbumin ist deshalb ein Marker für die Stärke der Sensibilisierung. In TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen lag der spezifische IgE-Titer an Tag 20 nach Beginn der Sensibilisierung bei ungefähr 1:150. In WT Kontrollen war ein IgE-Titer von etwa 1:50 nachweisbar (Abb. 15C). Allgemein werden Serumtiter von IgE bis zu Werten von ca. 1:50 als unspezifisch betrachtet. Titer von 1:150 gelten jedoch bereits als spezifisch. Bei den kleinen Gruppengrößen von acht TS2^{het}-neo-CD4Cre- und 3 WT Mäusen ist das Signifikanzniveau von $p=0,13$ ein erster Hinweis für einen Effekt des Cav1.2mut-Transgens auf eine verstärkte Generierung von spezifischem IgE nach Sensibilisierung mit Ovalbumin, dem in naher Zukunft nachgegangen werden soll.

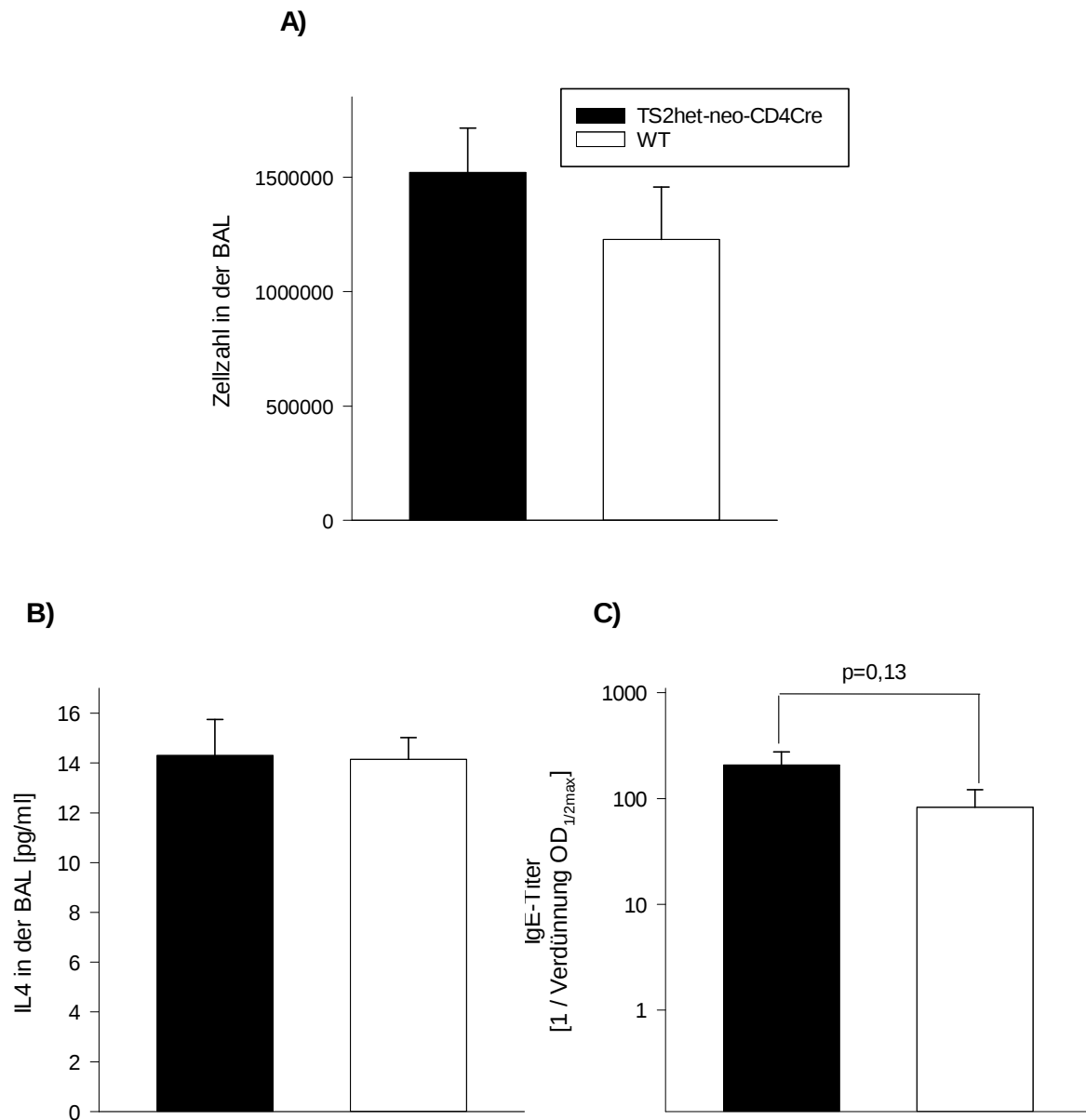


Abb. 15: Parameter der Ovalbumin-spezifischen Typ-1-Allergie in TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen.

TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäuse und WT Wurfgeschwister wurden an Tag 1 mit 100 µg Ovalbumin intraperitoneal sensibilisiert und an jedem der Tage 15-19 mit 125 µg Ovalbumin intranasal stimuliert. Nach einer bronchoalveolären Lavage wurde an Tag 20 die Gesamtzellzahl in einer Neubauer-Kammer (A) und der IL 4-Spiegel durch einen ELISA (B) bestimmt. Der ovalbuminspezifische IgE-Titer im Serum an Tag 20 (C) wurde per ELISA durch die Verdünnungsstufe mit halbmaximaler Optischer Dichte ermittelt. Die Signifikanz wurde durch den t-Test berechnet. {Gruppengrößen: A, B) TS2^{het}-neo-CD4Cre: n = 5; WT: n = 4. C) TS2^{het}-neo-CD4Cre: n = 8; WT n = 3.}

5 Diskussion

Lange Zeit galt die Annahme, dass spannungsabhängige Calciumkanäle nur in depolarisierbaren Zellen eine Rolle spielen. In den letzten Jahren häuften sich allerdings Berichte über biologisch relevante Effekte von spannungsabhängigen Kanälen wie dem $\text{Ca}_v1.2$ in nicht depolarisierbaren Zellen, wie zum Beispiel Zellen des Immunsystems [14]. Welche Wirkung ein Ionenkanal, dessen Öffnung und Schließung bisher mit der Veränderung des zellulären Membranpotentials erklärt wurde, in nicht depolarisierbaren Zellen hat, ist dabei noch weitgehend ungeklärt.

5.1 Mäuse mit der Timothy-2-Mutation zur Untersuchung der Funktion des $\text{Ca}_v1.2$ im Immunsystem

Untersuchungen zu etwaigen Effekten spannungsabhängiger Kanäle in Zellen des Immunsystems stehen unter anderem vor folgenden Herausforderungen:

1. **Große Homologien zwischen unterschiedlichen spannungsabhängigen Kanälen:** Spannungsabhängige Kanäle bilden eng verwandte Strukturfamilien. Neben $\text{Ca}_v1.2$ gibt es drei sehr ähnlich aufgebaute Kanäle, die zusammen die Gruppe der L-Typ Calciumkanäle bilden. Dihydropyridine sind spezifische Modulatoren an L-Typ Calciumkanälen, die je nach eingesetzter Substanz die Öffnungswahrscheinlichkeit der L-Typ Calciumkanäle entweder erniedrigen oder erhöhen [31]. Wegen der großen Homologie der L-Typ Calciumkanäle wirken alle Dihydropyridine jedoch auf die gesamte Gruppe der L-Typ Calciumkanäle ein. Die spezifische Untersuchung einzelner Kanalspezies wie des $\text{Ca}_v1.2$ ist somit mittels pharmakologischer Modulation nicht möglich.
2. **Pleiotropie spannungsabhängiger Kanäle:** Die korrekte Funktion von L-Typ Calciumkanälen ist in vielen Geweben des Körpers wichtig, teils sogar vital notwendig. Insbesondere bei der kardialen Erregung spielt die Funktion von L-Typ Kanälen eine sehr große und in den letzten Jahrzehnten gut erforschte Rolle [48, S. 13-16]. Manipulation an L-Typ Calciumkanälen im gesamten Organismus kann

weitreichende Effekte bis hin zum Tod des Organismus haben [3]. Wegen dieser hohen Relevanz von L-Typ Calciumkanälen insbesondere im Herz-Kreislauf-System ist darüber hinaus vorstellbar, dass weniger offensichtliche Funktionen der L-Typ Calciumkanäle zum Beispiel in Zellen des Immunsystems überlagert werden. So ist zum Beispiel denkbar, dass eine starke Veränderung des Blutdrucks durch Modulation der L-Typ Calciumkanäle im Herz-Kreislauf-System indirekt auch Auswirkungen auf das Immunsystem hat, ohne dass ein direkter Einfluss auf die Immunzellen besteht.

Modelle, in denen die Funktion von L-Typ Calciumkanälen im gesamten Organismus verändert wird, wie etwa durch systemischen Einsatz von Antisense-RNA gegen L-Typ Calciumkanäle, müssen deshalb kritisch betrachtet werden.

Von der Arbeitsgruppe Shamloo wurde eine transgene Maus generiert, die heterozygot die Cav1.2-aktivierende Timothy-2-Mutation trägt (TS2^{het}-neo-Mäuse) [3]. Diese Maus überkommt die oben beschriebenen Probleme bei der Untersuchung der Funktion des Cav1.2 im Immunsystem folgendermaßen:

1. Nur der Cav1.2 ist spezifisch von der kanalaktivierenden Timothy-2-Mutation betroffen. So kann er zielgerichtet untersucht werden.
2. Vor das Gen des veränderten, überaktiven Cav1.2 (Cav1.2mut) wurde eine invertierte Neomycin-Resistenz-Kassette gesetzt, um die Expression des Cav1.2mut im gesamten Organismus zu verringern. Dies war nötig, da Mäuse, die ohne Kassette heterozygot für die Timothy-2-Mutation sind, bereits in den ersten Tagen nach Geburt sterben [3]. Die Neomycin-Kassette wird von loxP-Sequenzen flankiert, welche von der Cre-Rekombinase erkannt werden können. Durch promotorabhängige Expression der Cre-Rekombinase kann so die Stoppkassette zelltypspezifisch oder induzierbar exziiert werden und so die Expression von Cav1.2mut potentiell gesteigert werden. Dies hat den Vorteil, dass Auswirkungen des Cav1.2mut im Gesamtorganismus gering bleiben, während die Funktion des Cav1.2 in einzelnen Zellreihen und / oder unter kontrollierten Bedingungen gezielt untersucht werden kann.

Durch diese Vorzüge wird der Einsatz von TS2^{het}-neo-Mäusen zu einem Modell für die Untersuchung der immunologischen Funktionen des Cav1.2. Folgende Limitationen sind hierbei zu beachten:

- Wegen der großen Relevanz des $\text{Ca}_v1.2$ im Herz-Kreislauf-System sterben homozygote Mäuse mit der Timothy-2-Mutation bereits intrauterin [3]. Nur heterozygote TS2^{het} -neo-Mäuse sind lebensfähig. Sie exprimieren neben $\text{Ca}_v1.2^{\text{mut}}$ auch den nicht mutierten $\text{Ca}_v1.2$. Um einen etwaigen Effekt des $\text{Ca}_v1.2^{\text{mut}}$ in untersuchten Zelltypen wahrzunehmen, müssen genug Kanäle der jeweiligen Zellen die Timothy-2-Mutation tragen.
- Der $\text{Ca}_v1.2$ kommt in zwei unterschiedlichen Spleißvarianten vor. Die Timothy-2-Mutation betrifft eine dieser beiden Spleißvarianten [41]. Je nach untersuchtem Gewebe variieren die relativen Anteile der Spleißvarianten. Ein Effekt des $\text{Ca}_v1.2$ ist nur messbar, wenn ausreichend Kanäle die Spleißvariante mit der Timothy-2-Mutation tragen.

Um diese beiden Limitationen des Einsatzes von TS2^{het} -neo-Mäusen genauer zu charakterisieren, wird sich an diese Arbeit eine Expressionsanalyse des $\text{Ca}_v1.2$ mit Bestimmung des Anteils von $\text{Ca}_v1.2^{\text{mut}}$ und der beiden Spleißvarianten in immunologischen Zellen anschließen.

Bei dieser Expressionsanalyse soll auch untersucht werden, wie stark die Expression des $\text{Ca}_v1.2^{\text{mut}}$ durch Aktivierung der Cre-Rekombinase zelltypspezifisch oder unter kontrollierten Bedingungen gesteigert wird. Bis dahin wird in dieser Arbeit von einer „potentiellen Expressionssteigerung“ des $\text{Ca}_v1.2^{\text{mut}}$ in TS2^{het} -neo-Mäusen mit promotorabhängiger Aktivierung der Cre-Rekombinase gesprochen.

Zusammenfassend bildet der Einsatz von TS2^{het} -neo-Mäusen unter Berücksichtigung der eben genannten Einschränkungen wegen der eingangs beschriebenen Probleme herkömmlicher Methoden einen geeigneten, neuen Ansatz zur Untersuchung der Funktion des $\text{Ca}_v1.2$ im Immunsystem.

5.2 Cav1.2 im erworbenen Immunsystem

Die Infektion der Maus mit dem Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) löst eine heftige Immunantwort unter Beteiligung großer Teile des Immunsystems aus [33, 47]. Dabei ist in den ersten Tagen nach Infektion speziell die T-Zell-Antwort für die Viruskontrolle notwendig [24]. Außerdem wird eine starke B-Zell-Antwort induziert [11]. Durch diese letzten beiden Faktoren wird die Infektion der Maus mit dem LCMV zu einem Modell, an dem sich sehr gut Aspekte des erworbenen Immunsystems beobachten lassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde kein Einfluss des Cav1.2 auf die Immunantwort nach Infektion mit dem LCMV in TS2^{het}-neo-Mäusen gefunden. Sowohl die Viruslast an unterschiedlichen Tagen, als auch die zytotoxische Aktivität von Milzzellen und die Expansion von T-Zellen an Tag 8 waren nach Infektion mit dem LCMV in TS2^{het}-neo-Mäusen gegenüber WT Mäusen unverändert.

Möglich ist, dass der Cav1.2 zwar einen Effekt auf die Immunantwort gegen das LCMV hat, die Expression des Cav1.2mut durch die Neomycin-Stoppkassette in TS2^{het}-neo-Mäusen allerdings so stark reduziert wird, dass dieser Effekt in TS2^{het}-neo-Mäusen nicht nachweisbar ist. Da für die Immunabwehr des LCMV in der akuten Infektion vor allem CD8⁺ zytotoxische T-Zellen notwendig sind, wurde die Infektion mit dem LCMV ebenfalls in TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen untersucht, in denen die Expression von Cav1.2mut in T-Zellen potentiell gesteigert ist [28]. Auch in TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen blieb der Verlauf der Infektion mit dem LCMV gegenüber WT Wurfgeschwistern allerdings unverändert.

Diese Befunde alleine lassen noch keine Aussage über das Fehlen einer Funktion des Cav1.2 im erworbenen Immunsystem zu. Wie oben beschrieben, ist hierzu die Expressionsanalyse des WT Cav1.2, des mutierten Cav1.2mut und der Spleißvarianten in den relevanten Zellen notwendig. Im Rahmen der Infektion mit LCMV soll hierfür zukünftig die Expression des Cav1.2 in Milzzellen von TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen an Tag 8 nach Infektion bestimmt werden.

Neben Cav1.2 gibt es weitere L-Typ Calciumkanäle. Insbesondere Cav1.1 und Cav1.4 werden in T-Zellen exprimiert und steuern unter anderem deren Stimulation und zelluläre Homöostase [4, 34, 36]. Um in dieser Arbeit neben den Funktionen des Cav1.2 auch die Rolle weiterer L-Typ Calciumkanäle im Immunsystem zu charakterisieren, kamen die sogenannten Dihydropyridine zum Einsatz, welche L-Typ Calciumkanäle modulieren [31]. Ihr Einsatz unterliegt den eingangs erwähnten

Problemen bezüglich pleiotroper Effekte der L-Typ Calciumkanäle bei systemischer Gabe der Modulatoren. Diese Probleme wurden umgangen, indem Dihydropyridine nur für *in vitro*-Versuche an spezifischen Zellen – bei Messung der virusspezifischen Zytotoxizität durch CD8⁺ Zellen als Effektoren und SV40-Zellen als Zielzellen – genutzt wurden.

Die Behandlung mit dem L-Typ Kanalschließer Nifedipin [44] verringerte die zytotoxische Aktivität von CD8⁺ Zellen aus WT Mäusen (Abb. 7A). Dies steht in Einklang mit Vorbefunden, in denen insbesondere der Ca_v1.4 als für die reguläre Funktion von CD8⁺ Zellen notwendig beschrieben wird [23].

Die CD8⁺ Zellen wurden mit zwei Konzentration Nifedipin behandelt: 10 µM und 100 µM. Die Konzentration von 10 µM gilt als spezifisch für die Modulation von L-Typ Calciumkanäle. Toxische Effekte des Nifedipin insbesondere in der Konzentration von 100 µM auf CD8⁺ Zellen als Effektoren oder Fibroblasten als Zielzellen sind grundsätzlich denkbar. Deswegen wurden CD8⁺ Zellen mehrfach auf Viabilität unter Behandlung mit Nifedipin geprüft. In Kontrollansätzen wurde außerdem die spontane Lyse von Fibroblasten ohne und mit Inkubation von Nifedipin verglichen (nicht dargestellt). In beiden eingesetzten Dosen des Nifedipin wurde weder für die CD8⁺ Zellen noch für die Fibroblasten ein Hinweis auf toxische Effekte gefunden.

Der L-Typ Kanalöffner Bay K8644 [42] hatte anders als der Kanalschließer Nifedipin keinen Effekt auf die virusspezifische Zytotoxizität von CD8⁺ Zellen (Abb. 7B). Mit 10 µM lag die eingesetzte Konzentration bereits an der Obergrenze des in der Literatur angegebenen Wirkungsbereichs [10, 22]. Vorstellbar ist zum einen, dass die mögliche virusspezifische Zytotoxizität einer definierten Anzahl CD8⁺ Zellen begrenzt ist – zum Beispiel, weil alle Granula mit lytischen Enzymen wie Perforin bereits ausgeschüttet wurden. Denkbar ist darüber hinaus, dass die L-Typ Calciumkanäle während der hohen Aktivität von CD8⁺ T-Zellen bei Lyse virusinfizierter Zellen bereits hoch aktiv sind, sodass die Behandlung mit Bay K8644 keine weiteren steigernden Effekte auf die Zytotoxizität ausüben kann, weil der Einfluss der L-Typ Calciumkanäle auf die Lyse der CD8⁺ Zellen ausgereizt wurde.

5.3 Ca_v1.2 im angeborenen Immunsystem

Die Infektion mit *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) löst eine starke und gut untersuchte, sequentielle Reaktion vieler Immunzellen aus [16]. Durch den Einsatz von TS2^{het}-neo-Mx1Cre-Mäusen wurde ein Überblick über diese Immunreaktion gewonnen. In TS2^{het}-neo-Mx1Cre-Mäusen führt die Ausschüttung von Interferon wie bei der Infektion mit *L. monocytogenes* zur Aktivierung des Mx1-Promotors, über den die Cre-Rekombinase reguliert wird [26]. So wird die Expression des Ca_v1.2mut nach Induktion endogenen Interferons potentiell systemisch gesteigert.

Ab Tag 5 nach Infektion überlebten mehr Mäuse mit der Timothy-2-Mutation als WT-Wurfgeschwister (Abb. 9A). In der Sequenz der Immunreaktion gegen *L. monocytogenes* werden in den ersten Tagen nach Infektion mit *L. monocytogenes* vor allem neutrophile Granulozyten und Makrophagen rekrutiert [43]. Die beobachteten Unterschiede im Überleben sind also wahrscheinlich auf einen Einfluss des Ca_v1.2 auf die Funktion von neutrophilen Granulozyten und / oder Makrophagen zurückzuführen. Es muss allerdings noch ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Differenzen im Überleben auf den eingangs beschriebenen pleiotropen Effekten einer systemischen Expressionssteigerung des Ca_v1.2mut beruhen: Der Mx1-Promotor wird nämlich in allen Geweben aktiviert wird, die mit Interferon in Kontakt kommen.

Zur Bestätigung der beobachteten erhöhten Überlebensrate von Mx1Cre-Mäusen gegenüber WT Wurfgeschwistern wurden TS2^{het}-neo-LysMCre-Mäuse eingesetzt, in denen die Expression des Ca_v1.2mut spezifisch in Zellen der myeloiden Reihe, vor allem Makrophagen und Granulozyten, potentiell erhöht ist [12]. Die Arbeitsgruppe um Plow hat gezeigt, dass Ca_v1.2 in Makrophagen exprimiert wird und dass die Blockade von Calciumkanälen vom L-Typ durch Dihydropyridine die Migration von Makrophagen in die Peritonealhöhle bei Entzündung hemmt [13]. Bei bisher wenigen eingesetzten Mäusen schienen nach Infektion mit *L. monocytogenes* in unseren Experimenten mehr TS2^{het}-neo-LysMCre-Mäuse mit der erhöhten Aktivität des Ca_v1.2mut im Vergleich zu WT Wurfgeschwistern zu überleben (Abb. 9B). Angesichts der Befunde der Arbeitsgruppe um Plow liegt die Interpretation nahe, dass die vermehrte Aktivität des Ca_v1.2mut die Migration von Makrophagen steigert, wodurch Bakterien schneller eliminiert werden.

Neben Einflüssen auf die Migration von Makrophagen hat der intrazelluläre Calciumspiegel auch Auswirkungen auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [7]. Diese werden von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten generiert, um Bakterien durch Oxidation zu inaktivieren [32, S. 80-82]. Die Basalproduktion von ROS durch neutrophile Granulozyten und

Makrophagen als Ausgangswert wurde in dieser Arbeit bestimmt: CD11b⁺ Zellen der Granulozyten- und Makrophagenlinie aus TS2^{het}-neo-LysMCre-Mäusen produzieren vergleichbare Mengen ROS wie Zellen aus WT Wurfgeschwistern (Abb. 12). Aufbauend auf diese Befunde soll als nächster Schritt die Produktion von ROS unter Stimulation der CD11b⁺ Zellen mit hitzeinaktivierten Listerien (HKLM) untersucht werden. Hierdurch wird die Konfrontation der CD11b⁺ Zellen mit Bakterien nachgestellt.

Es existieren nur sehr wenige Arbeiten über den Einfluss des Cav1.2 oder anderer L-Typ Calciumkanäle auf das angeborene Immunsystem [14]. Einige davon deuten an, dass L-Typ Calciumkanäle auf die Produktion von ROS einen Einfluss haben. Die Behandlung mit dem Kanalschließer Nifedipin soll die Produktion von ROS verringern [1, 25]. Die Produktion extrazellulärer ROS war in dieser Arbeit nicht nur durch Behandlung mit Nifedipin, sondern auch mit dem Kanalöffner Bay K8644 verringert. Dies könnte darauf hindeuten, dass es sich bei Ergebnissen der bisherigen Veröffentlichungen zur Produktion von ROS um unspezifische Effekte der Dihydropyridine handelt. Weiterführende Untersuchungen sind hierzu dringend notwendig.

5.4 Cav1.2 bei Typ-I-Allergien

Die klinische Bedeutung allergischer Erkrankungen von der leichten Pollinosis bis zum schweren Asthmaanfall steht außer Frage. Noch immer fehlen allerdings wichtige Erkenntnisse über genaue Mechanismen bei der Sensibilisierung gegen Allergene bei Typ-I-Allergien. Die Arbeitsgruppe Pelletier liefert mit ihren Untersuchungen zur Funktion des Cav1.2 in Typ-2-T-Helferzellen (T_{H2}-Zellen) einen bedeutenden Beitrag zur Aufklärung von Schlüsselfunktionen dieser Sensibilisierung [9, 19]: In T_{H2}-Zellen, nicht aber in Typ-1-T-Helferzellen, wird Cav1.2 exprimiert. Durch Antisense-RNA wurde die Translation des Cav1.2 gestört. Diese Reduktion des Cav1.2 führte zu einer verringerten bronchialen Obstruktion nach Provokation von sensibilisierten Mäusen mit Ovalbumin als Modellantigen.

Zur Untersuchung der Frage, welche Auswirkungen wiederum eine vermehrte Aktivierung des Cav1.2 bei der Sensibilisierung gegen Ovalbumin hat, ist der Einsatz von TS2^{het}-neo-Mäusen mit der Cav1.2-aktivierenden Timothy-2-Mutation geeignet. Da die Vorbefunde der Arbeitsgruppe Pelletier zeigen, dass Cav1.2 in T_{H2}-Zellen exprimiert wird, wurden TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäuse mit gesteigerter Expression des Cav1.2^{mut} in T-Zellen eingesetzt. In den ersten beiden durchgeführten Experimenten mit wenigen Mäusen finden sich Hinweise darauf, dass das Cav1.2^{mut}-Transgen die

allergische Reaktion verstärkt. Hierauf weist eine erhöhte intrabronchiale Zellzahl sowie ein erhöhter antigenspezifischer IgE-Titer in TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen gegenüber WT Wurfgeschwistern nach Sensibilisierung und Provokation mit Ovalbumin hin (Abb. 15 A,C).

Wegen der großen klinischen Relevanz von Allergien soll die Aufklärung der Funktion des Cav1.2 in T_{H2}-Zellen durch Einsatz weiterer TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäuse weitergeführt werden. Interessant ist darüber hinaus die Frage, ob die Modulation von L-Typ Calciumkanälen durch Dihydropyridine die allergische Reaktion verändert und sich so möglicherweise neue klinische Einsatzgebiete dieser Substanzgruppe ergeben.

5.5 Ausblick auf die Rolle des Cav1.2 im Immunsystem

Mit der Charakterisierung der immunologischen Funktionen des Cav1.2 in TS2^{het}-neo-Mäusen mit der bislang wenig untersuchten Cav1.2-aktivierenden Timothy-2-Mutation soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung des Einflusses von L-Typ Calciumkanälen auf das Immunsystem leisten.

Das Cav1.2mut-Transgen schien keine Auswirkung auf das erworbene Immunsystem zu haben. Die Expressionsanalyse des Cav1.2 zur Einordnung dieser Beobachtungen steht jedoch noch aus. Es wurden allerdings deutliche Hinweise für einen Effekt des Cav1.2 im angeborenen Immunsystem gefunden. Hierzu gibt es bislang nur sehr wenige Vorbefunde [14]. In dieser Arbeit schien die erhöhte Aktivität des Cav1.2mut bei der Infektion mit *L. monocytogenes* die Überlebensrate von Mäusen zu erhöhen. Außerdem wurde bei diesem Projekt die Funktion des Cav1.2 bei Typ-I-Allergien untersucht: Nach Einsatz der ersten Mäuse verstärkte die gesteigerte Aktivität des Cav1.2 in TS2^{het}-neo-CD4Cre-Mäusen anscheinend die allergische Reaktion bei Sensibilisierung gegen Ovalbumin.

Weiterhin sind viele Aspekte der immunologischen Funktionen des Cav1.2 im Speziellen und der L-Typ Calciumkanäle im Allgemeinen unerforscht. Kennzeichnend hierfür ist, dass aktuell die meisten Publikationen mehr Fragen aufwerfen, als sie beantworten: Eine Arbeit betonte die Interaktion von L-Typ Calciumkanälen mit anderen zellulären Proteinen wie der Proteinkinase C [37]. Eine weitere Gruppe fand Hinweise darauf, dass L-Typ Calciumkanäle im Immunsystem vorkommen,

aber so struktur- und funktionsgeändert exprimiert werden, dass sie nicht mehr spannungsabhängig sind [20]. Eine dritte Arbeit wiederum beschrieb in dendritischen Zellen spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle und postulierte, dass eine Depolarisation in Immunzellen in der frühen Infektionsphase zur Initiierung einer schnellen Immunreaktion vorteilhaft sein könnte [45].

Es ist noch offen, wie diese einzelnen, vielschichtigen Beobachtungen am Ende zusammengeführt werden können, um die Funktion von L-Typ Calciumkanälen im Immunsystem kohärent zu erklären.

Wegen der eingangs erwähnten Limitationen herkömmlicher Methoden bezüglich der großen Homologie und der Pleiotropie spannungsabhängiger Kanäle sind TS2^{het}-neo-Mäuse geeignet, auch in Zukunft zur Erforschung dieser noch offenen Fragen eingesetzt zu werden.

Als weiteren Zugangsweg zur Untersuchung der Funktion des Ca_v1.2 im Immunsystem sollte daneben eine Mauslinie eingesetzt werden, in der ein kontrollierter Knockout des Ca_v1.2 zum Beispiel durch Einsatz des Cre/loxP-Systems erreicht wird: Die Expression des nicht geänderten Ca_v1.2 im Gesamtorganismus wäre normal. Durch promotorgesteuerte Aktivierung der Cre-Rekombinase würde die Expression des WT Ca_v1.2 zelltypspezifisch oder unter kontrollierten Bedingungen gestoppt. Eine entsprechende Mauslinie existiert [40], wurde aber bislang nicht in der immunologischen Forschung eingesetzt. Dies wäre ein vielversprechender Ansatz zur Untersuchung einer verminderten Funktion des Ca_v1.2 im Immunsystem.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Einflüsse des spannungsabhängigen Calciumkanals $\text{Ca}_v1.2$ auf das Immunsystem in zwei Infektionsmodellen sowie einem Allergiemodell untersucht. Hierzu wurden Mäuse eingesetzt, die heterozygot für die dominante Timothy-2-Mutation ($\text{TS2}^{\text{het-neo}}$) sind. Durch die Timothy-2-Mutation (TS2) wird die Öffnungswahrscheinlichkeit des $\text{Ca}_v1.2$ erhöht. Neben $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäusen wurden unter Nutzung des Cre/loxP-Systems Mäuse eingesetzt, in denen die Expression der $\text{Ca}_v1.2$ -Variante mit der TS2 -Mutation ($\text{Ca}_v1.2\text{mut}$) zelltypspezifisch oder unter kontrollierten Bedingungen potentiell gesteigert ist.

Bei der akuten Infektion mit dem Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) wurde die Viruskontrolle durch das $\text{Ca}_v1.2\text{mut}$ -Transgen nicht beeinflusst. Für die Viruskontrolle sind vor allem CD8^+ T-Zellen notwendig. Die zytotoxische Aktivität dieser Zellen war in $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäusen und WT Mäusen gleich. Außerdem war die humorale Immunantwort unverändert. Es fand sich also kein Hinweis für einen Einfluss des $\text{Ca}_v1.2\text{mut}$ -Transgens auf die adaptive Immunantwort des T- oder B-Zell-Systems gegen eine akute systemische Virusinfektion.

Die akute Infektion mit *Listeria monocytogenes* überlebten mehr $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäuse als WT Wurfgeschwister. Es wurde untersucht, ob für diesen Unterschied die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten verantwortlich war. Myeloide Zellen aus $\text{TS2}^{\text{het-neo}}$ -Mäusen produzierten jedoch ähnliche Mengen ROS wie Zellen aus WT Wurfgeschwistern. Das $\text{Ca}_v1.2$ -Transgen scheint somit zur angeborenen Immunantwort gegen eine akute bakterielle Infektion beizutragen. Die genauen Ursachen hierfür müssen jedoch weiter erforscht werden.

Die Allergiereaktion nach Sensibilisierung mit dem Modellantigen Ovalbumin schien durch das $\text{Ca}_v1.2\text{mut}$ -Transgen verstärkt zu werden. Nach bisher zwei Pilotexperimenten deuten dies erhöhte Zellzahlen in der bronchoalveolären Lavage sowie erhöhte IgE-Titer im Serum an.

Mit dieser Arbeit wurde ein Überblick über die Funktion des $\text{Ca}_v1.2\text{mut}$ -Transgens im Immunsystem gewonnen. Hierbei wurden Effekte auf das angeborene Immunsystem sowie auf ein Allergiemodell gefunden. Die genauen Mechanismen hinter diesen Beobachtungen sollten näher untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Allanore, Y., D. Borderie, A. Perianin, H. Lemarechal, O. Ekindjian, and A. Kahan, *Nifedipine protects against overproduction of superoxide anion by monocytes from patients with systemic sclerosis*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(1): p. R93 - R100.
2. Alvarez-Dominguez, C., A.M. Barbieri, W. Beron, A. Wandinger-Ness, and P.D. Stahl, *Phagocytosed live Listeria monocytogenes influences Rab5-regulated in vitro phagosome-endosome fusion*. *The Journal of biological chemistry*, 1996. **271**(23): p. 13834-43.
3. Bader, P.L., M. Faizi, L.H. Kim, S.F. Owen, M.R. Tadross, R.W. Alfa, G.C. Bett, R.W. Tsien, R.L. Rasmusson, and M. Shamloo, *Mouse model of Timothy syndrome recapitulates triad of autistic traits*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011. **108**(37): p. 15432-7.
4. Badou, A., M.K. Jha, D. Matza, and R.A. Flavell, *Emerging roles of L-type voltage gated and other calcium channels in T lymphocytes*. *Frontiers in Immunology*, 2013. **4**.
5. Birx, D.L., M. Berger, and T.A. Fleisher, *The interference of T cell activation by calcium channel blocking agents*. *Journal of immunology*, 1984. **133**(6): p. 2904-9.
6. Bouabe, H. and K. Okkenhaug, *Gene targeting in mice: a review*. *Methods in molecular biology*, 2013. **1064**: p. 315-36.
7. Brookes, P.S., Y. Yoon, J.L. Robotham, M.W. Anders, and S.S. Sheu, *Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle*. *American journal of physiology. Cell physiology*, 2004. **287**(4): p. C817-33.
8. Brunner, K.T., J. Mael, J.C. Cerottini, and B. Chapuis, *Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs*. *Immunology*, 1968. **14**(2): p. 181-96.
9. Cabral, M.D., P.E. Paulet, V. Robert, B. Gomes, M.L. Renoud, M. Savignac, C. Leclerc, M. Moreau, D. Lair, M. Langelot, A. Magnan, H. Yssel, B. Mariame, J.C. Guery, and L. Pelletier, *Knocking down Cav1 calcium channels implicated in Th2 cell activation prevents experimental asthma*. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2010. **181**(12): p. 1310-7.
10. Chi, C.-C., C.-C. Huang, J.-M. Chien, S.-T. Chu, W.-C. Chen, H.-T. Chang, K.-L. Lin, J.-Y. Tsai, W.-C. Liao, C.-T. Chou, and C.-R. Jan, *L-type Ca²⁺ channel opener BayK 8644-induced Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release in human oral cancer cells (OC2)*. *Drug Development Research*, 2008. **69**(8): p. 508-513.
11. Ciurea, A., L. Hunziker, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner, *Viral escape from the neutralizing antibody response: the lymphocytic choriomeningitis virus model*. *Immunogenetics*, 2001. **53**(3): p. 185-9.
12. Clausen, B.E., C. Burkhardt, W. Reith, R. Renkawitz, and I. Forster, *Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice*. *Transgenic research*, 1999. **8**(4): p. 265-77.
13. Das, R., T. Burke, D.R. Van Wagoner, and E.F. Plow, *L-type calcium channel blockers exert an antiinflammatory effect by suppressing expression of plasminogen receptors on macrophages*, in *Circulation research* 2009. p. 167-75.
14. Davenport, B., Y. Li, J.W. Heizer, C. Schmitz, and A.-L. Perraud, *Signature channels of excitability no more: L-type channels in immune cells*. *Frontiers in Immunology*, 2015. **6**.
15. Dussurget, O., H. Bierne, and P. Cossart, *The bacterial pathogen Listeria monocytogenes and the interferon family: type I, type II and type III interferons*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2014. **4**: p. 50.
16. Edelson, B.T. and E.R. Unanue, *Immunity to Listeria infection*. *Current opinion in immunology*, 2000. **12**(4): p. 425-31.

17. Gegin, C. and F. Lehmann-Grube, *Control of acute infection with lymphocytic choriomeningitis virus in mice that cannot present an immunodominant viral cytotoxic T lymphocyte epitope*. Journal of immunology, 1992. **149**(10): p. 3331-8.
18. Gelfand, E.W., R.K. Cheung, S. Grinstein, and G.B. Mills, *Characterization of the role for calcium influx in mitogen-induced triggering of human T cells. Identification of calcium-dependent and calcium-independent signals*. European journal of immunology, 1986. **16**(8): p. 907-12.
19. Gomes, B., M.D. Cabral, A. Gallard, M. Savignac, P. Paulet, P. Druet, B. Mariame, M. Moreau, C. Leclerc, J.C. Guery, and L. Pelletier, *Calcium channel blocker prevents T helper type 2 cell-mediated airway inflammation*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2007. **175**(11): p. 1117-24.
20. Grafton, G., L. Stokes, K.M. Toellner, and J. Gordon, *A non-voltage-gated calcium channel with L-type characteristics activated by B cell receptor ligation*. Biochemical pharmacology, 2003. **66**(10): p. 2001-9.
21. Gupta, S., N. Salam, V. Srivastava, R. Singla, D. Behera, K.U. Khayyam, R. Korde, P. Malhotra, R. Saxena, and K. Natarajan, *Voltage gated calcium channels negatively regulate protective immunity to Mycobacterium tuberculosis*. PloS one, 2009. **4**(4): p. e5305.
22. Hadley, R.W. and J.R. Hume, *Calcium channel antagonist properties of Bay K 8644 in single guinea pig ventricular cells*. Circulation research, 1988. **62**(1): p. 97-104.
23. Jha, M.K., A. Badou, M. Meissner, J.E. McRory, M. Freichel, V. Flockerzi, and R.A. Flavell, *Defective survival of naive CD8+ T lymphocytes in the absence of the beta3 regulatory subunit of voltage-gated calcium channels*. Nature immunology, 2009. **10**(12): p. 1275-82.
24. Khanolkar, A., M.J. Fuller, and A.J. Zajac, *T cell responses to viral infections: lessons from lymphocytic choriomeningitis virus*. Immunologic research, 2002. **26**(1-3): p. 309-21.
25. Kouoh, F., B. Gressier, T. Dine, M. Luyckx, C. Brunet, L. Ballester, and J. Cazin, *Antioxidant Effects and Anti-Elastase Activity of the Calcium Antagonist Nicardipine on Activated Human and Rabbit Neutrophils—A Potential Antiatherosclerotic Property of Calcium Antagonists?* Cardiovascular Drugs and Therapy, 2002. **16**(6): p. 515-520.
26. Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet, and K. Rajewsky, *Inducible gene targeting in mice*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1427-9.
27. Langen, U., R. Schmitz, and H. Steppuhn, *Prevalence of allergic diseases in Germany*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2013. **56**(5): p. 698-706.
28. Lee, P.P., D.R. Fitzpatrick, C. Beard, H.K. Jessup, S. Lehar, K.W. Makar, M. Perez-Melgosa, M.T. Sweetser, M.S. Schlissel, S. Nguyen, S.R. Cherry, J.H. Tsai, S.M. Tucker, W.M. Weaver, A. Kelso, R. Jaenisch, and C.B. Wilson, *A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival*. Immunity, 2001. **15**(5): p. 763-74.
29. Lehmann-Grube, F. and J. Ambrassat, *A new method to detect lymphocytic choriomeningitis virus-specific antibody in human sera*. The Journal of general virology, 1977. **37**(1): p. 85-92.
30. Liao, P. and T.W. Soong, *CaV1.2 channelopathies: from arrhythmias to autism, bipolar disorder, and immunodeficiency*. Pflugers Archiv : European journal of physiology, 2010. **460**(2): p. 353-9.
31. Lipscombe, D., T.D. Helton, and W. Xu, *L-type calcium channels: the low down*. Journal of neurophysiology, 2004. **92**(5): p. 2633-41.
32. Murphy, K., P. Travers, M. Walport, and C. Janeway, *Janeway's immunobiology*. 8th ed 2012, New York: Garland Science. xix, 868 p.
33. Oldstone, M.B.A., *Biology and Pathogenesis of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection*, in *Arenaviruses II: The Molecular Pathogenesis of Arenavirus Infections*, M.B.A. Oldstone, Editor 2002, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 83-117.

34. Omilusik, K.D., L.L. Nohara, S. Stanwood, and W.A. Jefferies, *Weft, warp, and weave: the intricate tapestry of calcium channels regulating T lymphocyte function*. Frontiers in immunology, 2013. **4**: p. 164.
35. Pamer, E.G., *Immune responses to Listeria monocytogenes*. Nature reviews. Immunology, 2004. **4**(10): p. 812-23.
36. Pelletier, L. and M. Savignac, *Ca(2+) signaling in T-cell subsets with a focus on the role of cav1 channels: possible implications in therapeutics*. Frontiers in immunology, 2013. **4**: p. 150.
37. Robert, V., E. Triffaux, P.E. Paulet, J.C. Guery, L. Pelletier, and M. Savignac, *Protein kinase C-dependent activation of CaV1.2 channels selectively controls human TH2-lymphocyte functions*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2014. **133**(4): p. 1175-83.
38. Schwabe, U. and D. Paffrath, *Arzneiverordnungs-Report 2015*, 2015, Heidelberg: Springer.
39. Sheng, X., T. Nakada, M. Kobayashi, T. Kashiwara, T. Shibasaki, M. Horiuchi-Hirose, S. Gomi, M. Hirose, T. Aoyama, and M. Yamada, *Two mechanistically distinct effects of dihydropyridine nifedipine on CaV1.2 L-type Ca(2+)-channels revealed by Timothy syndrome mutation*. European journal of pharmacology, 2012. **685**(1-3): p. 15-23.
40. Specht, V., *Genetische Modifikation des $\alpha 1C$ L-Typ Kalziumkanals der Maus mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems* 2000, München.
41. Splawski, I., K.W. Timothy, L.M. Sharpe, N. Decher, P. Kumar, R. Bloise, C. Napolitano, P.J. Schwartz, R.M. Joseph, K. Condouris, H. Tager-Flusberg, S.G. Priori, M.C. Sanguinetti, and M.T. Keating, *Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism*. Cell, 2004. **119**(1): p. 19-31.
42. Thomas, G., M. Chung, and C.J. Cohen, *A dihydropyridine (Bay k 8644) that enhances calcium currents in guinea pig and calf myocardial cells. A new type of positive inotropic agent*. Circulation research, 1985. **56**(1): p. 87-96.
43. Unanue, E.R., *Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of Listeria resistance*. Current opinion in immunology, 1997. **9**(1): p. 35-43.
44. Vater, W., G. Kroneberg, F. Hoffmeister, H. Saller, K. Meng, A. Oberdorf, W. Puls, K. Schlossmann, and K. Stoepel, *[Pharmacology of 4-(2'-nitrophenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylic acid dimethyl ester (Nifedipine, BAY a 1040)]*. Arzneimittel-Forschung, 1972. **22**(1): p. 1-14.
45. Vukcevic, M., G.C. Spagnoli, G. Iezzi, F. Zorzato, and S. Treves, *Ryanodine receptor activation by Ca v 1.2 is involved in dendritic cell major histocompatibility complex class II surface expression*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(50): p. 34913-22.
46. Zhou, X., S. Ramachandran, M. Mann, and D.L. Popkin, *Role of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) in understanding viral immunology: past, present and future*. Viruses, 2012. **4**(11): p. 2650-69.
47. Zinkernagel, R.M., *Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Immunology*, in *Arenaviruses II: The Molecular Pathogenesis of Arenavirus Infections*, M.B.A. Oldstone, Editor 2002, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-5.
48. Zipes, D.P. and J. Jalife, *Cardiac electrophysiology : from cell to bedside*. 6th ed 2014, Philadelphia: Saunders.

8 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Kai Klaus Sporkmann
Geburtsdatum und -ort	14.06.1990, Oberhausen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Kontakt:	kai_sporkmann@hotmail.com

Facharztweiterbildung

Seit 09 / 2016	Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin II – Hämatologie und Internistische Onkologie des Universitätsklinikum Jena unter Leitung von Prof. Dr. Andreas Hochhaus
----------------	---

Hochschulausbildung

02 / 2013 – 02 / 2017	Promotionsarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene an der Universitätsklinik Köln unter Anleitung von Prof. Dr. Olaf Utermöhlen
10 / 2008 – 05 / 2015	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Köln Abschlussnote: Gut

Schulbildung

2002 – 2008	Abtei – Gymnasium – in Duisburg Abschluss: Abitur
-------------	--

Köln, den 19.10.2017