

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Institut für Virologie und Immunbiologie



**Einfluss der sauren Sphingomyelinase auf anti-virale
T-Zellantworten im Masernvirus-Infektionsmodell**

**Role of the acid sphingomyelinase in anti-viral T cell
responses in a measles virus infection model**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse Immunmodulation

Vorgelegt von

Claudia Beate Hollmann

geboren in München

Würzburg, 2017

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer: PD Dr. Niklas Beyersdorf

2. Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies

3. Betreuer: Prof. Dr. Alexandra Schubert-Unkmeir

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Einfluss der sauren Sphingomyelinase auf anti-virale T-Zellantworten im Masernvirus-Infektionsmodell“ eigenständig, d. h. selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	8
Summary	10
1. Einleitung	12
1.1. Klassen und Aufbau von Sphingolipiden	12
1.2. Sphingomyelinasen und deren Aktivierung	13
1.3. Funktion von Sphingolipiden	16
1.4. Funktion von Sphingomyelinasen und Ceramiden in T-Zellen	17
1.5. Regulatorische T-Zellen	20
1.5.1. Entstehung und Charakteristika	20
1.5.2. Suppressionsmechanismen	22
1.6. Masernviren - Taxonomie, Morphologie und Pathogenese	25
1.7. Maserninfektionsmodell	26
1.8. Interaktionen von Viren und Sphingomyelinasen	28
1.9. Zielsetzung der Arbeit	29
2. Material	30
2.1. Biochemische Reagenzien	30
2.1.1. Chemikalien	30
2.1.2. Farbstoffe und Kits	31
2.2. Antikörper	32
2.3. Geräte	33
2.4. Lösungen, Puffer und Medien	34
2.5. Software	36
2.6. Verbrauchsmaterial	36
3. Methoden	38
3.1. Zellbiologische Methoden	38
3.1.1. Gewinnung von Milz- und Lymphknotenzellen	38
3.1.2. Gewinnung von T-Zellen aus dem Gehirn mittels Percollgradienten	38
3.1.3. Bestimmung der Zellzahl	39

3.1.4.	Zellaufreinigung -----	39
3.1.5.	Massenspektroskopische Analysen -----	40
3.1.6.	Einbau von Ceramiden und Clickreaktion -----	41
3.1.7.	Asm Aktivitätsassay-----	41
3.1.8.	Bestimmung der Serumkonzentration von Amitriptylin und Nortriptylin -----	42
3.1.9.	Viruszucht, Virusaufreinigung und Titerbestimmung -----	43
3.2.	<i>In vitro</i> Kulturen -----	44
3.2.1.	Suppressionsassay -----	44
3.2.2.	Capture-Assay -----	44
3.2.3.	<i>In vitro</i> Kulturen in Gegenwart von Asm-Inhibitoren -----	45
3.3.	Tierexperimentelle Methoden -----	45
3.3.1.	Mäuse -----	45
3.3.2.	<i>In vivo</i> Behandlung von Mäusen mit Amitriptylin -----	46
3.3.3.	Intrazerebrale Maserninfektion-----	46
3.3.4.	Depletion regulatorischer T-Zellen in Foxp3-DTR Mäusen-----	46
3.3.5.	PFA-Perfusion von Mäusen und Präparation der Gehirne-----	47
3.3.6.	Anfertigung histologischer Gehirnschnitte mittels Vibratom -----	47
3.4.	Immunologische Methoden-----	48
3.4.1.	FACS-Analyse-----	48
3.4.2.	Statistische Auswertung -----	49
4.	<i>Ergebnisteil</i> -----	50
4.1.	Regulatorische T-Zellen zeigten im Vergleich zu konventionellen T-Zellen eine erhöhte Asm Aktivität-----	50
4.2.	Treg Zellen enthielten mehr Ceramid als naive Tconv Zellen und besaßen eine veränderte Lipidordnung -----	51
4.3.	Asm-defiziente Tiere wiesen eine erhöhte Treg-Frequenz und Funktion auf--	56
4.3.1.	Gesteigerte Suppressivität der Treg Zellen aus Asm ^{-/-} Mäusen -----	56
4.3.2.	Erhöhter CTLA-4 Umsatz als mögliche Ursache für die verstärkte Treg-vermittelte Suppression -----	58
4.3.3.	Erhöhte Frequenz von regulatorischen T-Zellen in Asm ^{-/-} Mäusen -----	59
4.4.	Desipramin-induzierter Treg-Frequenzanstieg wurde durch den selektiven Zelltod von Tconv Zellen bedingt -----	61
4.4.2.	Behandlung von wildtypischen Mäusen mit Amitriptylin erhöhte die Treg-Frequenz <i>in vivo</i> -----	62

4.4.3.	Nachweis der Wirkspezifität von Asm Inhibitoren ausschließlich auf WT T-Zellen anhand eines Zelltransferexperiments	64
4.4.4.	IL-2 schützte Treg Zellen vor der Asm induzierten Apoptose	66
4.4.5.	Desipramin induzierte Apoptose in T-Zellen	68
4.5.	Defizienz oder pharmakologische Hemmung der Asm führte <i>in vivo</i> zu einer verstärkten Maserninfektion (MV).....	69
4.5.1.	Erhöhte Anzahl MV-infizierter Neuronen in Asm ^{-/-} Mäusen.....	69
4.5.2.	Während der akuten Phase nach MV Infektion wiesen Asm ^{-/-} Mäuse eine verringerte Anzahl an Masernvirus-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen auf	71
4.5.3.	Behandlung von MV-infizierten Mäusen mit Amitriptylin imitierte den Krankheitsverlauf von Asm ^{-/-} Mäusen	78
4.5.4.	Eine Erhöhung der Infektionsrate durch Amitriptylin war nur in Gegenwart von Regulatorische T-Zellen möglich	80
5.	<i>Diskussion</i>	83
5.1.	Unterschiede im Ceramidgehalt und der Lipidordnung in Treg und Tconv Zellen	83
5.2.	Asm Defizienz oder Inhibition hatte Auswirkungen auf das Treg Kompartiment und die Treg Funktion	85
5.3.	Einfluss der Asm auf die anti-virale Immunantwort nach Maserninfektion	90
6.	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	97
7.	<i>Literaturverzeichnis</i>.....	99
8.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	108
9.	<i>Danksagung</i>	111
10.	<i>Wissenschaftlicher Werdegang</i>	112

Zusammenfassung

Die saure Sphingomyelinase (Asm), ein Enzym des Sphingolipidmetabolismus, spaltet Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphocholin. Aktiviert wird die Asm unter anderem durch Stimulation des CD28 Rezeptors. CD28 Signale werden auch für die Aktivierung von konventionellen T-Zellen (Tconv) und für die Kostimulation benötigt und sind essentiell für die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (Treg) im Thymus und deren Erhalt in der Peripherie. Wir konnten zeigen, dass sich Tconv und Treg Zellen hinsichtlich der Asm unterscheiden. Treg haben eine höhere "basale" Asm Aktivität, widergespiegelt im höheren Ceramidgehalt und haben eine niedrigere Lipidordnung als Tconv Zellen. Die Abwesenheit der Asm in defizienten Mäusen bewirkt einen relativen Anstieg der Treg-Frequenz innerhalb der CD4⁺ T-Zellen. Außerdem führt die Asm-Defizienz in Treg Zellen zu einer erhöhten Umsatzrate des immunsupprimierenden Moleküls CTLA-4 und zu einer verstärkten Suppressivität von Treg Zellen aus Asm^{-/-} Mäusen gegenüber Wildtyp Zellen. Ein Anstieg in der Treg-Frequenz, äquivalent zur genetischen Defizienz, kann auch durch Inhibition der Asm, d. h. durch Wirkstoffe wie Amitriptylin und Desipramin erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibitorbehandlung die absolute Anzahl der Tconv Zellen selektiv verringert, da Treg Zellen gegenüber dem Asm Inhibitor-induzierten Zelltod resistenter sind. Mechanistisch erklärbar sind die Unterschiede gegenüber den proapoptischen Inhibitoreffekten zwischen Tconv und Treg Zellen dadurch, dass Treg Zellen durch die Anwesenheit von IL-2 geschützt sind. In Abwesenheit von IL-2 sterben die Treg Zellen ebenfalls. Die gezielte Veränderung des Verhältnisses von Treg zu Tconv durch den Einsatz von Asm-inhibitorischen Medikamenten kann hilfreich bei der therapeutischen Behandlung von inflammatorischen- und Autoimmunerkrankungen sein.

Inwiefern die Asm für die Funktion von T-Zellen in der anti-viralen Immunantwort entscheidend ist, wurde im Masernvirus-Infektionsmodell näher untersucht. In Asm^{-/-} Mäusen und Amitriptylin-behandelten Mäusen konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit der Asm die Kontrolle der Masernvirusinfektion verschlechtert ist. Treg sind auch hier von entscheidender Bedeutung, da die Asm-abhängige, verstärkte Masernvirusinfektion bei Fehlen der Asm nur in Gegenwart von Treg auftritt. In der akuten Phase gibt es in Asm^{-/-} Mäusen weniger masernvirusspezifische T-Zellen und

dadurch eine verringerte Beseitigung der Viruslast. In der chronischen Phase ist die Anzahl masernvirusspezifischer T-Zellen zwischen WT und $Asm^{-/-}$ Mäusen vergleichbar. In Letzteren ist allerdings die Anzahl und Frequenz von T-Zellen im Gehirn infizierter Mäuse noch deutlich erhöht, was die verstärkte Maserninfektion widerspiegelt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die *Asm* die Funktion von Treg moduliert und einen Einfluss auf das Verhältnis von Tconv und Treg zueinander hat. Im Masernvirus-Infektionsmodell kann die Veränderung des Tconv zu Treg Verhältnisses in Abwesenheit der *Asm* ursächlich für die verringerte Viruskontrolle sein. Die *Asm* Inhibitor-induzierte Treg-Aktivierung und die Beeinflussung des Treg zu Tconv Verhältnisses können wiederum für therapeutische Zwecke genutzt werden, wie beispielsweise bei Multipler Sklerose und Rheumatoider Arthritis.

Summary

The acid sphingomyelinase (Asm), an enzyme of the sphingolipid metabolism, hydrolyses sphingomyelin into ceramide and phosphocholine. Besides other stimuli the Asm is activated by ligation of the costimulatory molecule CD28. CD28 signaling is necessary to activate conventional T-cells (Tconv) and is crucial for the differentiation and maintenance of thymus-derived regulatory T-cells (Treg). We could demonstrate that Tconv and Treg cells differ with respect to Asm activity. Treg cells have an increased "basal" Asm activity resulting in an elevated level of ceramide and show a decreased lipid order compared to Tconv cells. The absence of Asm leads to a relative increase in Treg frequency among CD4⁺ T-cells in Asm-deficient mice. Furthermore, the Asm deficiency results in an increased turnover rate of the immunosuppressive molecule CTLA-4 and strengthens the suppressive capacity of Treg cells from Asm^{-/-} mice compared to wild type Treg cells. An increase of the Treg cell frequency, equivalent to that seen with genetic deficiency, can be achieved by drugs like amitriptyline and desipramine too. The inhibitor treatment selectively decreases the absolute numbers of Tconv cells as Treg cells are more resistant towards Asm inhibitor induced cell death. The mechanistic explanation for the difference concerning the proapoptotic effects of Asm inhibitors between Treg and Tconv cells is that Treg cells are protected by IL-2. In the absence of IL-2 Treg cells die too. Therapeutically shifting the balance of Treg and Tconv cells by Asm-inhibiting drugs can be beneficial in inflammatory and autoimmune diseases.

Whether the Asm is necessary for the function of T-cells during anti-viral immune responses was investigated in a measles virus infection model. In Asm^{-/-} mice and amitriptyline treated mice control of the measles virus was impaired. Treg cells are of critical relevance as the Asm dependent boost in measles infection was only visible in the presence of Treg cells. During the acute phase of infection less measles virus specific T-cells were present leading to a decreased clearance of virus from the brains of Asm^{-/-} mice. In the chronic phase the number of measles virus specific T-cell was comparable between wt and Asm^{-/-} mice. But in the latter the number and frequency of T-cells in brains of infected mice was increased, which mirrors the enhanced measles virus infection.

In conclusion, the Asm modulates the function of Treg cells and influences the Treg-Tconv ratio. The changed Treg-Tconv ratio in the absence of Asm expression might be responsible for the reduced virus control in the measles virus infection model. Additionally, the Asm inhibitor induced Treg cell activation and its effects on the Treg-Tconv ratio can be used for therapeutical approaches in diseases like multiple sclerosis or rheumatoid arthritis.

1. Einleitung

1.1. Klassen und Aufbau von Sphingolipiden

Strukturelle Hauptbestandteile eukaryotischer Membranen sind, neben Cholesterol und Glycerophospholipiden, die Sphingolipide. Charakteristisch für Sphingolipide ist die gemeinsame Kernstruktur, das Sphingosin, ein langkettiger, einfach ungesättigter Aminoalkohol. Unterschiedliche Sphingolipide können durch Acylierung der Aminogruppe mit einer ein- oder zweifach ungesättigten Fettsäure und Veresterung einer polaren Kopfgruppe dargestellt werden. Demzufolge ist Ceramid, bestehend aus Sphingosin, einer Fettsäure und einem Wasserstoff, das einfachste Sphingolipid. Verschiedene polare Kopfgruppen unterscheiden weitere, komplexere Sphingolipide: basische Glykosphingolipide, unterteilt in Cerebroside und Ganglioside, und Sphingomyelin, welche als polare Kopfgruppe Phosphocholin enthalten ¹⁻³. Sphingomyelin steht im Fokus der vorliegenden Arbeit.

Die genannten Sphingolipide werden im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat gebildet. Der Grundbaustein Ceramid wird durch sechs verschiedene Ceramid-Synthetasen *de novo* im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Ausgehend von Ceramid werden komplexe Sphingolipide wie Sphingomyelin, Sphingosin-1-Phosphat, Galactosyl-Ceramid, Glucosyl-Ceramid und Ceramid-1-Phosphat, von unterschiedlichen Enzymen im Golgi-Apparat gebildet ^{1,4-6}. Dieser Prozess ist reversibel, dementsprechend entsteht Ceramid auch durch Hydrolyse komplexer Sphingolipide. Beispielsweise wird Sphingomyelin durch die saure bzw. die neutrale Sphingomyelinase zu Ceramid und Phosphocholin hydrolysiert ⁷.

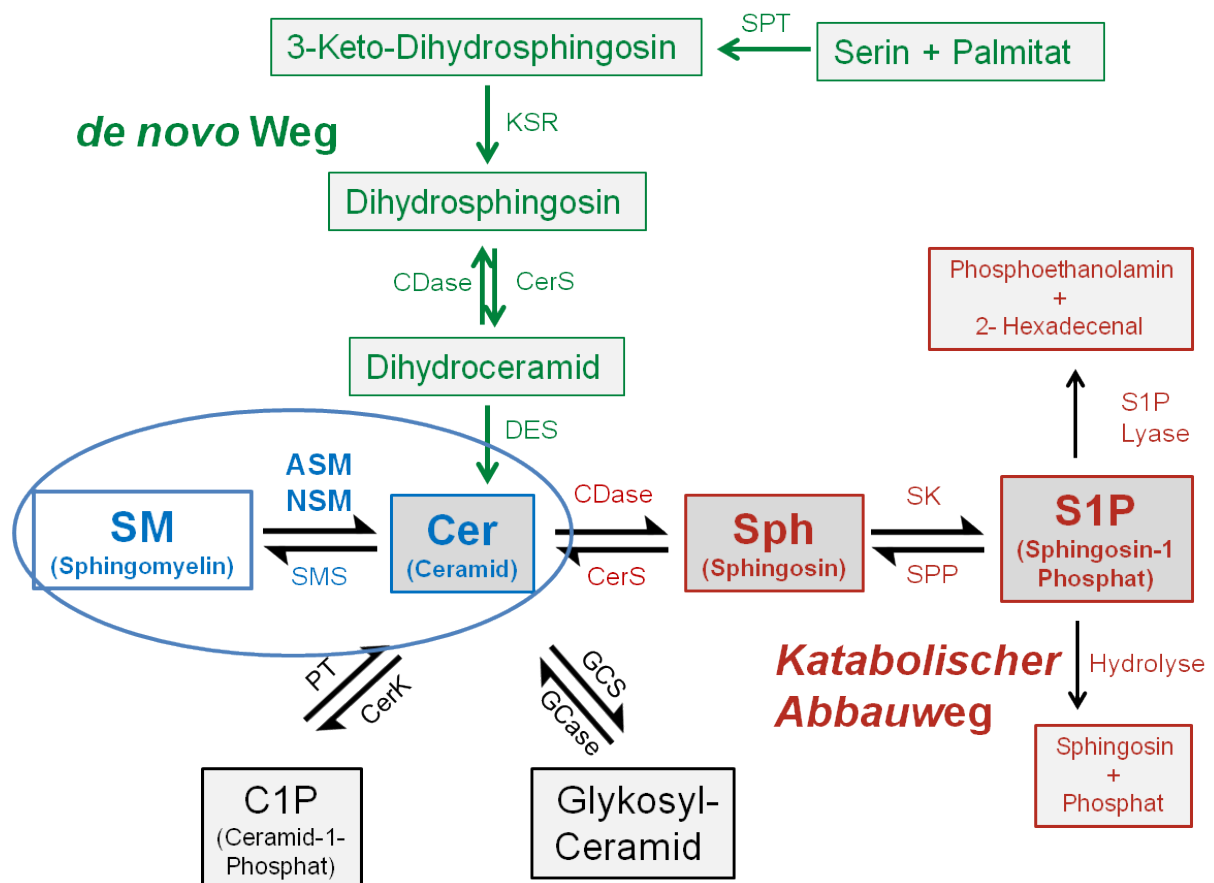


Abb. 1 Sphingolipidmetabolismus

In einem reversiblen Prozess wird Sphingomyelin (SM) durch die saure bzw. neutrale Sphingomyelinase zu Ceramid umgesetzt. Ceramid wird weiter zu Ceramid-1-Phosphat (C1P), Glycoceramiden verstoffwechselt, oder über Sphingosin (Sph) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) zu Ethanolaminen und Hexadecenal abgebaut. Ceramid kann auch *de novo* generiert werden. SPT: Serin-Palmitoyl-CoA-acyltransferase, KSR: 3-Ketosphinganin-Reduktase, CerS: Ceramidsynthase, DES: Ceramid-Desaturase, ASM: saure Sphingomyelinase, NSM: neutrale Sphingomyelinase, SMS: Sphingomyelin-Synthase, CDase: Ceramidase, SK: Sphingosinkinase, SPP: Sphingosin-1-Phosphat Phosphatase, CerK: Ceramidkinase, PT: Phosphatase, GCS: Glucosylceramidsynthase, GCcase: Glucosylceramidase. Grafik aus Romero-Guevara et al. 2015⁸, abgeändert durch Claudia Hollmann.

1.2. Sphingomyelinasen und deren Aktivierung

Die saure Sphingomyelinase (ASM human, Asm murin) ist, wie der Name schon sagt, im sauren pH Bereich bei pH 5 aktiv, während die neutrale Sphingomyelinase (NSM human, Nsm murin) bei einem pH Wert von 7 bis 8 arbeitet⁹. Beide Sphingomyelinasen unterscheiden sich weiterhin in ihrer Position in der Plasmamembran. Die aktive ASM/Asm liegt auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran, welche reich an Sphingomyelin ist. Dorthin gelangt die Asm aus endolysosomalen Kompartimenten. Die lysosomale ASM/Asm wird über intrazelluläre Vesikel zur Plasmamembran transportiert, wo diese mit der Zellmembran verschmelzen und die ASM/Asm auf dem äußeren Blatt der Membran

exponiert wird ¹⁰⁻¹³. Neben der eben beschriebenen lysosomalen Form (L-Form) der ASM/Asm gibt es noch die sekretorische Form (S-Form). L- und S-Form sind unterschiedliche Splicing Formen des Gens *SMPD1* (*sphingomyelin phosphodiesterase 1*) und unterscheiden sich im Grad der Glykolisierung und in ihrer Abhängigkeit von Zinkionen ^{14,15}. Entsprechend ist die Lokalisierung verschieden, die lysosomale Form befindet sich in endolysosomalen Kompartimenten wohingegen die lösliche Form über den Golgi-Apparat-Sekretionsweg freigesetzt wird ^{15,16}.

Die NSM/Nsm ist im Gegensatz zur Asm auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert. Auch hier unterscheidet man verschiedene Subgruppen, die sich durch Lage und Aufgabe unterscheiden: die NSM1, NSM2, NSM3 und die Mitochondrien-assoziierte NSM ¹. Allerdings ist die NSM2 die Einzige, die Sphingomyelin spaltet und spezifisch durch den Inhibitor GW4869 blockiert werden kann ¹.

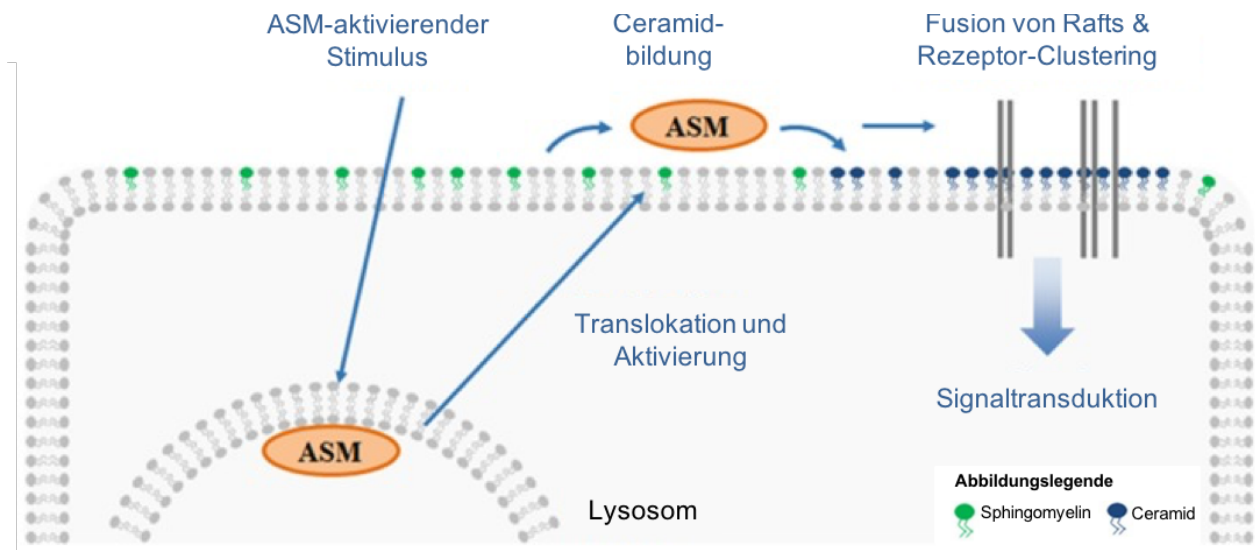


Abb. 2 Translokation der Asm aus Lysosomen an die Plasmamembran und Asm-induzierte Bildung von Ceramidplattformen.

Die Asm befindet sich in Lysosomen, respektive an der Innenseite der lysosomalen Membran. Aktivierende Signale führen zur Translokation der Asm zur extrazellulären Seite der Plasmamembran durch den Transport der Asm in Vesikeln. Das durch die Asm generierte Ceramid akkumuliert zu Mikrodomänen, die anschließend fusionieren und Ceramid-reiche Plattformen bilden. Lipidplattformen beeinflussen die laterale Verteilung von Proteinen und damit auch die Clusterbildung von Rezeptoren. Auf diese Weise modulieren Sphingomyelinasen Ceramid-Signalwege. Abbildung aus der Veröffentlichung von Beckmann et al. 2014¹⁴, abgeändert durch Claudia Hollmann.

Eine Aktivierung von Sphingomyelinasen kann durch Ligation pro-apoptotischer Rezeptormoleküle wie CD95 (Fas), TNF-Rezeptoren und Interleukin- 1 β Rezeptoren induziert werden. Außerdem führt eine Ligation von DC-Sign (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) durch Antikörper oder durch Masernviren zur

Aktivierung von Sphingomyelinasen ^{14,17-21}. Die Ligation von CD28 führt zu einer spezifischen Aktivierung der ASM/Asm ²², wohingegen die NSM/Nsm durch alleinige CD3 Stimulation oder durch Kostimulation von CD3 und CD28 aktiviert wird ²²⁻²⁴. Im Fall einer Kostimulation von CD3 und CD28 kommt es zu keiner Aktivierung der ASM/Asm ^{10,17,23}.

Wie wichtig die Funktion der ASM/Asm ist, zeigt sich darin, dass im Menschen eine genetisch Defizienz der ASM zur Niemann-Pick-Erkrankung führt. Bei dieser lysosomalen Speicherkrankheit kommt es zur Akkumulierung von Sphingomyelin in endo-lysosomalen Kompartimenten. Verursacht wird dies durch die fehlende Aufspaltung von Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphocholin ^{14,25}.

Asm Knockout Mäuse spiegeln den Phänotyp der Typ A Form der Niemann-Pick Erkrankung wieder ²⁵. Die neonatale und frühe Entwicklung ist bei diesen Tieren normal, aber ab einem Alter von 12-16 Wochen erkranken die Mäuse aufgrund der Asm Defizienz. Sphingomyelin reichert sich vor allem in der Leber und im Gehirn der Tiere an. In Letzterem führt die Speicherung von Sphingomyelin in neuronalen Membranen zu einer abnormalen Synapsenbildung und Neuronenfunktion ²⁵⁻²⁷. Daher weisen Asm^{-/-} Mäuse starke Ataxie, Tremor und weitere neurologische Einschränkungen auf und haben eine verkürzte Lebenszeit von 6 Monaten ²⁵⁻²⁷.

Trizyklische Antidepressiva wie Amitriptylin und Desipramin hemmen die ASM/Asm Aktivität ^{14,28}. Ursprünglich entwickelt als Inhibitoren der Wiederaufnahme von Serotonin-Norepinephrin, wirken sie auch anti-histaminerg, anticholinerg sowie anti-inflammatorisch ¹⁴. Chemisch gesehen sind Amitriptylin und Desipramin schwache Basen mit hoher Lipophilie, die den Molekülen ermöglicht durch Membranen zu diffundieren. Im Lysosom werden sie protoniert, was eine Rückdiffusion unterbindet und zu einer Ansammlung der Inhibitoren führt. Diese konkurrieren mit der Asm um die Membranbindung, es kommt zur Ablösung der Asm und deren Inaktivierung durch proteolytische Degradation ^{14,29-31}.

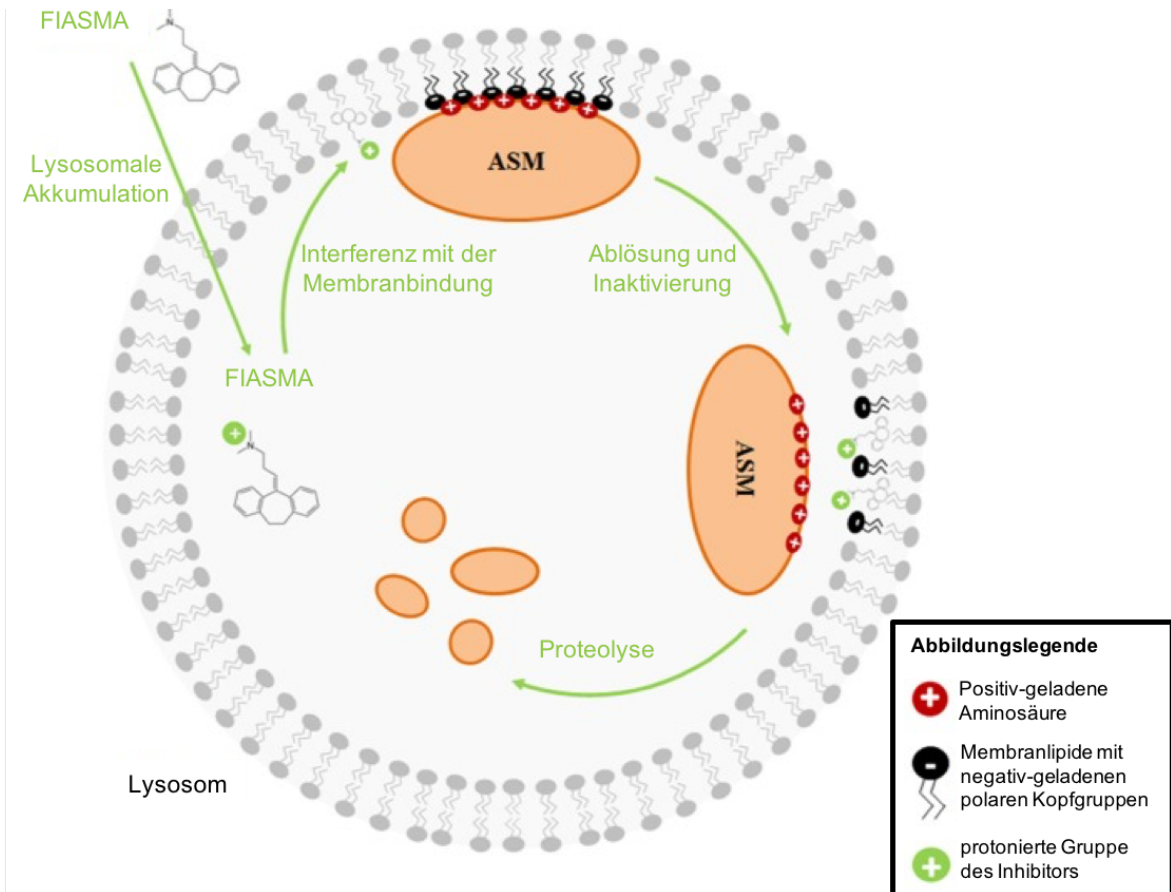


Abb. 3 Mechanistische Funktionsweise von Asm Inhibitoren

Die Asm ist durch elektrostatische Kräfte an die innere Membran von Lysosomen gebunden. Asm Inhibitoren diffundieren in das Lysosom und akkumulieren dort, da die schwachen Basen aufgrund des sauren pH-Wertes protoniert werden und hiermit am Zurückdiffundieren gehindert werden. Der lipophile Teil der Asm Inhibitoren lagert sich an der Membran ein, während der durch die Protonierung positiv-geladene Teil des Inhibitors ins Lumen zeigt. Dies führt zur Veränderung der Ladung der Membran und zum Verlust der elektrostatischen Bindung der Asm an die Membran. Die im Lumen frei vorliegende, inaktive Asm wird durch lysosomale Proteasen gespalten und abgebaut. Abbildung aus der Veröffentlichung Beckmann et al. 2014, die Abkürzung FIASMA = "functional inhibitors of acid sphingomyelinase" steht für Asm Inhibitoren.

1.3. Funktion von Sphingolipiden

Die Produkte der Sphingomyelinspaltung durch Sphingomyelinasen, insbesondere Ceramid, haben Einfluss auf die Zusammensetzung von Membranen. Das generierte Ceramid akkumuliert zu Ceramid-reichen Membrandomänen, welche dicht gepackt und stark hydrophob sind und dadurch Cholesterin ausschließen^{14,32,33}. Diese Ceramid-reichen Mikrodomänen beeinflussen die Sortierung und Position von Proteinen und deren Signalosomen in der Membran, sowie die laterale und vertikale Verteilung von Rezeptoren. Der Aufbau der Membran wiederum beeinflusst die Zellbeweglichkeit und Proliferation, die Aktivierung und klonale Expansion von T-

Zellen, sowie die Induktion von Apoptose und spielt auch eine Rolle bei der Aufnahme von Pathogenen^{20,34–38}.

Neben ihrem Einfluss auf die Membraneigenschaften haben die Produkte des Sphingomyelinweges, Ceramid, Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat, auch eine bioaktive Wirkung. So konnte gezeigt werden, dass Ceramid an der Hemmung von Zellwachstum und Differenzierung beteiligt ist³⁹. Insbesondere fördert Ceramid den Zelltod in Form von Apoptose^{10,40–42}, Nekrose⁴³ und Seneszenz^{42,44}. Des Weiteren ist die Asm-abhängige Freisetzung von Ceramid und die Bildung von Ceramidreichen Plattformen Grundvoraussetzung für die Clusterbildung von CD95^{11,13,45}. Der CD95/Fas Apoptoseweg ist ein wichtiger Mechanismus zur Regulation der T-Zell Homöostase und entscheidet über die Terminierung von T-Zell Antworten durch Depletierung aktivierter T-Zellen⁴⁶.

Ähnlich wie Ceramid wirkt auch Sphingosin pro-apoptotisch und anti-mitogen, indem es die Proteinkinase C inhibiert und dadurch an der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts, sowie an Zellproliferation, – wachstum und -überleben beteiligt ist^{4,47}. Entgegengesetzte Effekte vermittelt Sphingosin-1-Phosphat (S1P), welches anti-apoptotisch wirkt und das Zellwachstum und die Zellproliferation fördert⁴⁸. Aber auch für das Immunsystem spielt S1P eine wichtige Rolle, da es die vaskuläre Integrität, die Zytokin und Chemokinproduktion, sowie die Migration von Lymphozyten beeinflusst⁴⁹. Die Expression des Sphingosin-1-Phosphat-1 Rezeptors (S1P₁) entscheidet darüber, ob T-Zellen den Lymphknoten verlassen können oder nicht⁵⁰. In Treg Zellen blockiert S1P₁ durch selektive Aktivierung des Akt-mTOR Signalwegs die Differenzierung thymischer Treg Vorläuferzellen ebenso wie die periphere Generierung von induzierten Tregs^{51,52}. Gleichzeitig fördert S1P₁ die Differenzierung zu proinflammatorischen T-Helfer-1 (Th1) Zellen und manipuliert dadurch die Immunhomöostase⁵².

1.4. Funktion von Sphingomyelinasen und Ceramiden in T-Zellen

Der Einfluss der ASM/Asm und des Ceramids auf die Zellmembraneigenschaften und Veränderungen in der Rezeptorenverteilung in der Plasmamembran beeinflusst eine Reihe von Prozessen in T-Zellen, darunter die Aktivierung von T-Zellen, die

klonale Expansion und Apoptose. Ceramidakkumulation infolge der Sphingomyelinaseaktivität führt in T-Zellen zu einer Verminderung der Aktinzytoskelettdynamik, einer verschlechterten Ausbildung von Membranfortsätzen, verringertem T-Zell "spreading", und verminderter T-Zellpolarisierung^{23,53}.

Auch auf den T-Zell-Rezeptor (TZR) haben Sphingomyelinasen und Ceramid direkten Einfluss. Abhängig von der Dosis hat Ceramid eine gegensätzliche Wirkung auf die TZR-Regulation. Niedrige Mengen von Ceramid induzieren eine TZR-Hochregulation, was besonders wichtig in der frühen Rezeptorstimulation ist. Dagegen führen hohe Ceramidkonzentrationen zu einer Herunterregulation des TZR und einer Spaltung der dazugehörigen ζ Kette, wodurch die Rezeptorstimulation abgeschwächt wird⁵⁴. In verschiedenen Arbeiten wurde auch gezeigt, dass CD3 Signale zusammen mit exogen zugeführter Asm oder C2-Ceramiden, anstelle des kostimulatorischen CD28 Signales, zur T-Zell Stimulation und Proliferation führen könnte^{22,55}. In einer späteren Arbeit wurde bestätigt, dass die Asm T-Zellproliferation vermittelt und dass das entstehende Ceramid die CD4 T-Zellaktivierung moduliert (Bai et al. 2015). Inwiefern die Asm die T-Zelldifferenzierung beeinflusst, ist noch nicht komplett geklärt. Prinzipiell funktioniert die Differenzierung zu pathogenen Th1, Th2 und Th17 Zellen auch in Asm-defizienten Tieren, gezeigt in EAE (Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis) und GvHD (Graft-versus-Host Disease) Mausmodellen⁵⁷. Andere Ergebnisse zeigen, dass in humanen CD4⁺ T-Zellen nach Blockade der Asm durch Inhibitoren die Generierung und der Erhalt von Th17 Zellen vermindert ist^{56,58}. Die Asm steht auch im Zusammenhang mit Apoptose und inhibitorischen Signalwegen in T-Zellen. CD95 Stimulation naiver T-Zellen führt zur Aktivierung der Asm und Freisetzung von Ceramid. Infolgedessen kommt es zur Hemmung von CRAC (Calcium release-activated channel) Kanälen und zu einer entsprechenden Blockierung des Kalziumsignals. Ein intakter Kalziumsignalweg wiederum ist unerlässlich für die TZR-Aktivierung.⁴¹ Zudem induzieren die gebildeten Ceramid-reichen Membrandomänen die Clusterbildung von CD95 Rezeptoren und es kommt zur Induktion von Apoptose in aktivierten T-Zellen¹⁰.

Es besteht auch ein direkter Zusammenhang zwischen T-Zell Aktivierung und Lipidordnung besteht⁵⁹. T-Zellen mit einer hohen Lipidordnung bilden langsamer

immunologische Synapsen mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aus, diese sind jedoch sehr stabil. Dagegen weisen T-Zellen mit einer intermediären Lipidordnung eine instabile Synapsenbildung auf. T-Zellen mit niedriger Ordnung sind unempfindlich gegenüber TZR-Stimulierung⁵⁹. Die Stabilität der Synapsen korreliert mit der Zellfunktion. Zellen mit einer hohen Ordnung weisen eine erhöhte Proliferation und IL-2 / IL-4 Produktion auf und sind vorwiegend naive, unstimulierte T-Zellen. Aktivierte Effektor/Gedächtniszellen weisen eine intermediäre Lipidordnung auf, proliferieren weniger und produzieren IFN γ . T-Zellen mit einer niedrigen Membranordnung haben einen aktivierten Phänotyp, sind unstimulierbar und gehen tendenziell leicht in Apoptose⁵⁹.

ASM/Asm Defizienz bewirkt unter anderem auch eine Störung des Vesikeltransports⁶⁰. In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass T-Zellen Asm-defizienter Mäuse im Vergleich zu T-Zellen aus Wildtyp Mäusen eine verringerte IL-2 Sekretion nach CD3/CD28 Kostimulation aufweisen⁶¹. Allerdings wurde bisher nicht der direkte Zusammenhang zwischen der Störung des Vesikeltransports und der IL-2 Sekretion gezeigt. Neben einer verringerten Sekretion ist auch die IL-2 Produktion inhibiert. Sowohl exogene Sphingomyelinase, als auch direkte Ceramidgabe verringern die Kinaseaktivität von PKC θ und PKC α , welche wiederum an der NF κ B Aktivierung beteiligt sind. Die Repression von NF κ B durch Ceramid führt konzentrationsabhängig zur Reduktion der IL-2 Gentranskription⁶². IL-2 wird für die Proliferation von konventionellen T- Zellen (Tconv) benötigt und ist essentiell für die Funktion von regulatorischen T-Zellen (Treg)⁶³⁻⁶⁹. IL-2 verbessert auch die Expansion von CD8⁺ T-Zellen und ist wichtig für die Bildung von Gedächtnis T-Zellen⁷⁰. Es konnte gezeigt werden, dass in Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus infizierten, Asm-defizienten Mäusen die primäre CD8 Antwort verringert ist. Eine funktionelle Asm wird für die Ausschüttung von IFN γ durch CD8⁺ T-Zellen benötigt sowie für die Sekretion zytotoxischer Granula⁶⁰. Vermutlich ist also die Asm Aktivität nicht nur wichtig für die Kontrolle der IFN γ Ausschüttung, sondern auch für die Freisetzung von anderen proinflammatorischen Zytokinen. Eine gezielte Inhibition der ASM/Asm könnte daher in der Therapie verschiedener Erkrankungen von Nutzen sein. Beispielsweise wäre es förderlich, bereits in der Induktionsphase der EAE, einem Tiermodell für Multiple Sklerose, die Ausschüttung von IL-17 durch CD8 T-Zellen zu unterbinden. Es gibt

bereits Studien mit ASM/Asm Inhibitoren die zeigen, dass eine Hemmung der ASM/Asm den Verlauf von Erkrankungen wie beispielsweise T-Zell vermittelter Autoimmunität und GvHD verbessert ⁷¹. In einem Mausmodell der Allergischen Rhinitis führt die ASM/Asm Blockade zu einer Verlagerung des T-Zell Gleichgewichts von pathogenen Th17 Zellen hin zu protektiven Treg Zellen ⁷².

Eine weitere Studie zeigt, dass CD4⁺ T-Zellen von SLE (Systemischer Lupus erythematoses) Patienten einen erhöhten Transport von Glykosphingolipiden aufweisen und sich daraufhin dieses in intrazellulären Kompartimenten anreichert. Diese Abweichung im Glykosphingolipidhaushalt ist vermutlich verantwortlich für die abnormale, hyperaktive T-Zell Funktion bei SLE ⁷³. T-Zellen aus SLE Patienten haben eine erhöhte Umsatzrate vom TZR-assoziierten Protein CD4⁺ und von CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) zur Oberfläche, was vermutlich mit einer erhöhten Transportrate von Glykosphingolipiden im Zusammenhang steht ^{73,74}. Die Verbindung von CTLA-4 und Glykosphingolipiden ist sehr interessant, da CTLA-4 ein wichtiges inhibitorisches Molekül regulatorischer T-Zellen ist.

1.5. Regulatorische T-Zellen

1.5.1. Entstehung und Charakteristika

Regulatorische T-Zellen sind Immunzellen, deren Funktion es ist, andere Immunzellen zu inhibieren und somit Immunantworten zu regulieren und zu terminieren. Dadurch tragen sie einen wichtigen Teil zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz bei ^{75,76}. 1995 wurden erstmals CD4⁺ CD25⁺ Zellen beschrieben, die dauerhaft die IL-2 Rezeptor α -Kette (CD25) exprimieren und supprimierend wirken ⁷⁵. Diese Arbeit zeigt außerdem, dass BALB/c Lymphozyten, in denen CD4⁺CD25⁺ Zellen depletiert wurden, nach einem Transfer in athymische BALB/c nude Mäuse (nu/nu), eine Autoimmunerkrankung auslösen ⁷⁵. Später wurde forkhead box protein 3 (Foxp3) als charakteristischer Transkriptionsfaktor identifiziert, der für die Entwicklung und Funktion von Treg Zellen unerlässlich ist ⁷⁷⁻⁷⁹. Das Fehlen von Foxp3 oder dessen Mutation führt in Foxp3 Knockout oder Scurfy Mäusen zu einer Treg Defizienz und einem letalen Autoimmunsyndrom ^{77,80}. Beim Menschen führen Mutationen im Foxp3 Gen zur IPEX Erkrankung (immuno-dysregulation, polyendokrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome), einer fatalen Autoimmunerkrankung ^{80,81}.

Foxp3 reguliert in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor ca. 700 Gene, meistens in Form von einer negativen Regulation, beispielsweise als transkriptionaler Repressor⁸²⁻⁸⁴ oder durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren^{85,86}. Teilweise verstärkt Foxp3 aber auch die Genexpression, wie es bei CTLA-4 der Fall ist⁸²⁻⁸⁴.

Treg Zellen machen circa 10-15 % der peripheren CD4⁺ T-Zellen aus⁷⁵. Es gibt zwei Arten: zum einen werden Treg Zellen im Thymus gebildet, sogenannte natürlichen T-Zellen, zum anderen können Treg Zellen unter bestimmten Bedingungen in der Peripherie entstehen⁸⁷. Diese sogenannten induzierten Treg Zellen differenzieren unter Einfluss von IL-2 und TGFβ aus CD4⁺ CD25⁻ Tconv Zellen zu CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg Zellen und üben vorwiegend eine TGFβ- und IL-10 vermittelte Suppression aus⁸⁸.

Im Thymus, dem Ort an dem auch die T-Zell-Selektion im Allgemeinen stattfindet, werden regulatorische T-Zellen durch Selbstantigenenerkennung generiert. Bei der T-Zellentwicklung müssen T-Zellvorläufer ein schwaches TZR-Signal aufweisen, um positiv selektiert zu werden. Gleichzeitig darf dieses TZR-Signal nicht zu stark sein, da sonst die Gefahr der Differenzierung zu autoreaktiven T-Zellen besteht. Diese potenziell autoreaktiven Zellen werden durch Negativselektion aussortiert⁸⁹. Natürliche, Thymus-generierte Treg Zellen entwickeln sich, wenn das TZR-Signal für Selbstantigene intermediär zu der TZR-Stärke der positiven und negativen Selektion ist^{90,91}. Anschließend kommt es zur Hochregulierung der hochaffinen CD25 α Kette. IL-2 fördert über Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5 die Foxp3 Expression. Treg Zellen emigrieren nach ihrer Entstehung aus dem Thymus und zirkulieren durch den Körper oder wandern ins Gewebe ein⁹². Das Überleben der Treg Zellen sowie ihre suppressive Funktion sind abhängig vom Überlebenssignal IL-2^{93,94}. Außerdem wird ein tonisches CD28 Signal in regulatorischen T-Zellen für deren Erhalt und Funktion benötigt^{67,68,95}. Dies steht im Gegensatz zur Rolle von CD28 in Tconv Zellen. Dort verstärkt der CD28 Stimulus das TZR-Signal qualitativ und quantitativ und wird zur vollständigen Aktivierung der Tconv benötigt, jedoch nicht für deren Homöostase⁹⁶.

In der Peripherie, insbesondere im darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT), können durch Fremd- oder Selbstantigenenerkennung regulatorische T-Zellen generiert

werden. Unter homöostatischen, nicht-entzündlichen Bedingungen und dem Vorliegen einer chronischen Stimulation durch sehr geringe Antigenmengen (z.B. Nahrungsmittel, Allergene), kommt es zur Induktion von iTregs. Die Genese von iTregs erfolgt auch bei sehr starker TZR-Stimulation in Abwesenheit einer zeitgleichen Kostimulation. *In vitro* differenzieren $CD4^+$ $Foxp3^-$ Tconv Zellen zu induzierten Treg Zellen in Gegenwart von IL-2 und $TGF\beta$ oder Retinolsäure bei zeitgleicher TZR-Stimulation⁸⁷. Alternativ kann die Anwesenheit von IL-10 oder IL-27 die Differenzierung zu $Foxp3^-$ regulatorischen Tr1 Treg Zellen induzieren⁹⁷.

1.5.2. Suppressionsmechanismen

Treg Zellen sind unerlässlich für den Erhalt der immunologischen Homöostase und der peripheren Toleranz. Um Autoimmunität und überschießende Immunantworten zu verhindern, müssen Immunreaktionen beendet werden und Immunzellen aktiv supprimiert werden. Regulatorische T-Zellen haben eine Vielzahl von Mechanismen zur Zellsuppression entwickelt. Zum einen sezernieren sie Mediatoren wie IL-10, $TGF\beta$, IL-35 und Galectin-3, die auf Effektor-T-Zellen eine immunregulatorische Wirkung haben^{91,98,99}. Zum anderen können Treg Zellen proinflammatorische Immunzellen direkt über die Induktion von Apoptose eliminieren, die entweder durch Galectin-1 vermittelt wird oder abhängig von Granzymen ist⁹⁹⁻¹⁰¹.

Indirekt können Treg Zellen durch Modulation des metabolischen Haushalts das Wachstum und die Proliferation von T-Zellen beeinflussen. Treg Zellen exprimieren konstitutiv die CD25 α Kette, die zusammen mit der β - und γ -Kette trimerisieren und den hochaffinen IL-2 Rezeptor bildet¹⁰⁰. Über diesen hochaffinen Rezeptor konsumieren Treg Zellen IL-2 aus der Umgebung, was zur IL-2 Deprivation in anderen Zellen führt. IL-2 stellt für alle Lymphozyten einen sehr wichtigen Wachstums- und Differenzierungsfaktor dar und wird hauptsächlich durch konventionelle T-Zellen gebildet. Treg Zellen dagegen können selbst kein IL-2 produzieren und sind entsprechend auf das IL-2 der Tconv Zellen angewiesen. Die IL-2 Deprivation erhöht den Schwellenwert für eine Immunantwort und kann zur Apoptoseinduktion in schwach aktivierten Tconv Zellen führen^{88,91,100,102}. Treg Zellen können auch den cAMP (cyclic adenosine monophosphate) und ATP (Adenosintriphosphat) Haushalt von konventionellen Zellen beeinflussen. Einerseits

weisen Treg Zellen selbst ein hohes Level an cAMP auf und können cAMP via Gap Junctions in Tconv Zellen transferieren, wo es zu einer Unterdrückung der Zellproliferation und Hemmung der IL-2 Synthese führt ^{100,103}. Andererseits exprimieren Treg Zellen auch die Oberflächenenzyme CD39 und CD73, welche extrazelluläres ATP und ADP (Adenosindiphosphat) zu Adenosin umwandeln können. Die Bindung von Adenosin an den purinergen Rezeptor A2A auf Tconv Zellen ruft eine Akkumulierung des intrazellulären cAMPs hervor und führt zu einer Suppression der T-Zell Effektorfunktionen ^{91,100,103}. Die Aktivierung des A2A Rezeptors hat auch die Inhibierung der IL-6 Expression zufolge, fördert die Generierung von TGF β und begünstigt auf diese Weise die Bildung von induzierten Treg Zellen ¹⁰⁰.

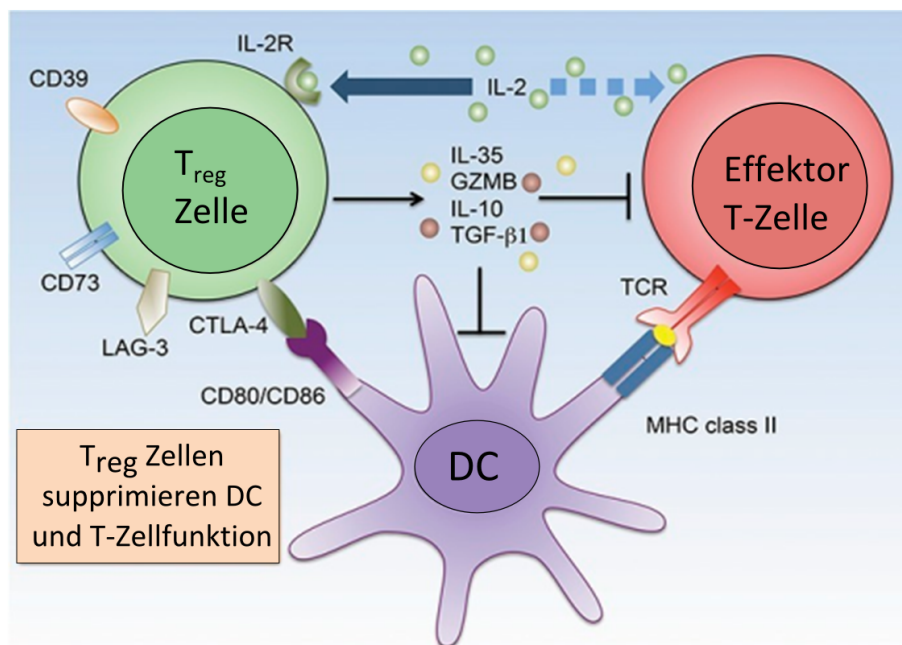


Abb. 4 Treg-vermittelte Suppressionsmechanismen

Direkte Suppressionsmechanismen umfassen die Produktion von immunsuppressiven Zytokinen (IL-10, TGF β , IL-35) und die Produktion von zytolytischen Effektormolekülen wie Granzym B und Perforin. Indirekt können Effektor-T-Zellen durch Veränderungen im Metabolismus (ATP Haushalt) und durch Deprivation von IL-2 beeinflusst werden. Außerdem modulieren Treg Zellen die Kommunikation zwischen Effektor-T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle durch immunregulierende Oberflächenmoleküle (CTLA-4 und LAG-3). Abbildung aus der Veröffentlichung Geem et al. 2015 ¹⁰⁴, verändert durch Claudia Hollmann.

Des Weiteren können Treg Zellen Antigen-präsentierende Zellen, welche wichtige Signale für die Effektor-T-Zellen liefern, in ihrer Funktion verändern. Gereifte Dendritische Zellen sind durch eine hohe Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 sowie MHC II (Major histocompatibility complex)

gekennzeichnet, die unerlässlich für eine effektive T-Zell Stimulation sind. Einen gegenteiligen Effekt bewirken unreife DC, welche nur wenige kostimulatorische Moleküle exprimieren und dadurch T-Zell Anergie bewirken ¹⁰⁵. Treg Zellen exprimieren LAG3 (lymphocyte activation gene 3), welches an MHC II Moleküle auf Dendritischen Zellen bindet und dadurch deren Reifung verhindert ^{91,100}. Weiterhin exprimieren Treg Zellen CTLA-4, welches ebenso wie CD28 an CD80/CD86 auf konventionellen T-Zellen bindet. Durch die höhere Bindeaffinität von CTLA-4 wird die Bindung von CD28 an CD80/86 kompetitiv gehemmt ^{91,100}. Die Bindung von CTLA-4 führt zusätzlich zur Hochregulation von Indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO) in Dendritischen Zellen. IDO katalysiert die Konversion von Tryptophan zum toxischen Kynurenin. Zusätzlich führt Tryptophan-Deprivation zur Apoptose in Tconv Zellen ^{99,106}.

CTLA-4 kann die Bindung von CD28 an CD80/CD86 nicht nur blockieren, sondern die CD80/CD86 Moleküle sogar durch einen Prozess namens Transendozytose entfernen ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. CTLA-4 Moleküle zirkulieren in hoher Frequenz zwischen den intrazellulären Speichern und der Zelloberfläche hin und her ¹⁰⁹. Die Internalisierung von CTLA-4 von der Plasmamembran erfolgt in Clathrin und Dynamin-abhängiger Weise ¹¹⁰. Ebenfalls Clathrin-abhängig ist die Internalisierung von Transferrin über den Transferrinrezeptor ¹¹¹. Hier konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Transferrin an seinen Rezeptor zur Aktivierung der Asm führt und mit der Generierung von Ceramid gekoppelt ist ¹¹¹. Dementsprechend könnte die Asm auch einen Einfluss auf die CTLA-4 Zirkulation in der Treg Zellen haben.

Veränderungen in der Membran durch die Asm Aktivität können potenziell auch bei anderen Prozessen von Bedeutung sein, die im Zusammenhang mit Vesikeltransport und Exozytose stehen. Beispielsweise könnte in Treg Zellen die Abwesenheit der Asm die Freisetzung von inhibitorischen Zytokinen verändern oder die Freisetzung von Granzymen beeinflussen. Die Tatsache, dass Treg Zellen eine kontinuierliche CD28 Rezeptorstimulation für Erhalt und Funktion benötigen und CD28 wiederum die saure Sphingomyelinase aktiviert legt nahe, dass für Treg Zellen die saure Sphingomyelinase von besonderer Bedeutung sein könnte.

1.6. Masernviren - Taxonomie, Morphologie und Pathogenese

Um die Funktion der sauren Sphingomyelinase in T-Zellen nicht nur im naiven Tier zu untersuchen, sondern auch im Rahmen einer akuten Immunantwort, wurde ein Masernvirenmodell genutzt. Das Masernvirenmodell wurde gegenüber anderen Mausmodellen bevorzugt, da dieses Modell Treg-sensitiv ist. Wie zuvor gezeigt werden konnte, tritt eine verstärkte Masernvirusinfektion in Gegenwart von einer erhöhten Anzahl von Treg Zellen auf, dagegen verbessert sich der Krankheitsverlauf wenn die Treg Zellen depletiert wurden ¹¹².

Masernviren (MV), aus der Familie der Paramyxoviridae (Gattung Morbilliviren), gehören zu den RNA Viren ^{113,114}. Das Virus besteht aus den sechs Strukturproteinen: Hämagglutinin- (H)-Protein, Fusions- (F)-Protein, Matrix- (M)-Protein, Nukleokapsid- (N)-Protein, Phospho- (P)-Protein und Large- (L)-Protein. Funktionell dient das L-Protein als katalytische Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, während das P-Protein als regulatorischer Ko-Faktor der Polymerase fungiert ^{113,114}. Die Glykoproteine H und F sind in der viralen Hülle integriert. Das H Protein ermöglicht die Virusbindung an die Wirtszelle, während das F Protein durch Membranfusion von Virus und Wirtszelle den Eintritt in die Wirtszelle vermittelt ^{113,114}. Bisher wurden zwei Eintrittsrezeptoren beschrieben: zum einen CD150 (signalling lymphocyte activation molecule, SLAM) ^{115,116} und zum anderen der Komplementbindungsrezeptor CD46 (membrane cofactor protein, MCP). Letzterer wird zwar auf allen Zellen exprimiert, kann aber nur von Masernvirus-Impfstämmen als Eintrittsrezeptor genutzt werden ¹¹⁶. Im Gegensatz dazu kann CD150 auch von Wildtypisolaten verwendet werden, allerdings wird dieser Rezeptor nur auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Gedächtniszellen, Makrophagen und reifen, dendritischen Zellen exprimiert ^{116,117}. Nachdem auch Epithel-, Endothel- und Neuronale Zellen durch Masernviren infiziert werden, gibt es vermutlich noch mindestens einen weiteren, unbekanntem Rezeptor ^{118,119}.

Der Mensch ist der einzige Wirt des Masernvirus, weshalb es eine Impfkampagne gibt mit dem Ziel das Virus bis 2020 auszurotten ¹²⁰. Zwischen den Jahren 2000 und 2015 sank die Anzahl der Todesfälle durch Masernviren um 78 %. Dennoch verliefen im Jahr 2015 weltweit noch 134.200 Infektionen tödlich ^{120,121}. Besonders verbreitet

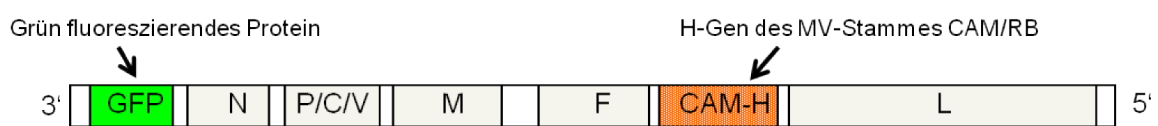
ist die Masernerkrankung in Entwicklungsländern ¹²⁰. Masern ist eine sehr ansteckende Erkrankung und wird über Tröpfcheninfektion übertragen. Über die Atemwege aufgenommen, infiziert das Masernvirus zunächst CD150⁺ Makrophagen und Dendritische Zellen im respiratorischem Trakt ^{122,123}. Von dort aus gelangt das Virus zu den lokalen lymphatischen Organen, wo die verstärkte Virusreplikation und Vermehrung stattfindet. Über den Blutstrom wird das Virus im gesamten Körper verteilt, wobei die Verbreitung zumeist Zell-assoziiert durch infizierte Monozyten und Lymphozyten erfolgt ^{124,125}. Später kommt es auch zur Infektion von Epithel- und Endothelzellen der Haut, was zum Auftreten des charakteristischen, makulopapulösen Masernexanthem führt, hervorgerufen durch die Zerstörung infizierter Epithelzellen der Haut. In seltenen Fällen kann auch das zentrale Nervensystem (ZNS) infiziert werden, wenn das Virus im Blutstrom die Epithelzellen der Blut-Hirn-Schranke infiziert und von dort aus weitergegeben wird. Alternativ ist es möglich, dass infizierte Leukozyten durch die Blut-Hirn-Schranke transmigrieren und das Virus im Gehirn an andere Zellen weitergeben ¹²⁶⁻¹²⁸. In seltenen Fällen entwickelt sich daraufhin eine Enzephalitis, eine Entzündung der Hirnhaut. Beim Menschen gibt es nach Maserninfektion drei Formen der Enzephalitis: die akute, postinfektiöse Masern-Enzephalitis (APME), die Einschlusskörperchenenzephalitis (MIBE) und die subakute, sklerosierende Panenzephalitis (SSPE). Die APME ist wie der Name schon sagt, eine akute Enzephalitis, die sich kurz nach dem Erscheinen des Hautausschlages entwickelt und nur eine geringe Sterblichkeitsrate hat ^{129,130}. Die anderen beiden Formen, MIBE und SSPE, sind persistierende ZNS-Infektionen, die stets tödlich verlaufen. MIBE kommt häufig bei Immunsupprimierten Patienten vor. SSPE tritt meist Jahre nach der Primärinfektion auf und entwickelt sich meist wenn diese im frühen Kindesalter (0-2 Jahre) auftrat, einem Alter in dem das Immunsystem noch nicht ausgereift ist ¹²⁹⁻¹³¹.

1.7. Maserninfektionsmodell

Für die nähere Untersuchung des Masernvirus und der Masernvirusinfektion gibt es verschiedenen Tiermodelle ¹³². In diesem Labor wird ein persistentes Infektionsmodell verwendet, bei dem Mäuse mit einem neurotrophen, rekombinanten Masernvirus (rMV^{E_{dtag}}eGFP-CAMH) infiziert werden. Das Virus ist insofern modifiziert, als dass es das Hämagglutinin (H) eines Nager-adaptierten Virusstammes (CAM/RB)

enthält ^{133,134}. Außerdem ist unter Kontrolle des Viruspromotors eine Gensequenz für das grün fluoreszierende Protein (GFP) integriert und entsprechend wird GFP immer exprimiert, wenn die RNA-abhängige RNA Polymerase aktiv ist. Darin liegt auch der große Vorteil des Modells: infizierte Zellen können leicht durch das GFP detektiert werden und durch das Nager-adaptierte H-Protein können normal Mäuse infiziert werden, ohne dass eine transgene Expression des MV-Rezeptors notwendig ist. Nach intrazerebraler Infektion von 2-Wochen-alten Mäusen mit dem rekombinanten Virus entwickeln 80 % der Mäuse eine persistente ZNS-Infektion ¹³⁴.

A Recombinantes Masernvirus rMV^{Ectag}_eGFP-CAMH



B

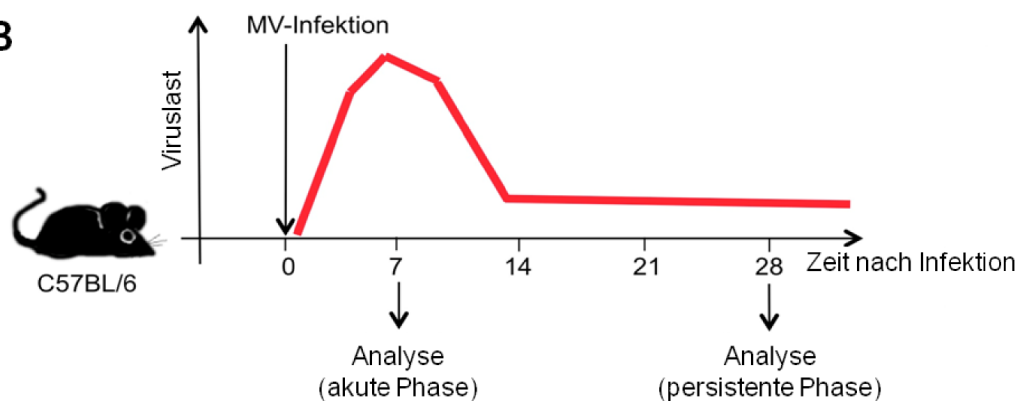


Abb. 5 Aufbau des rekombinanten Masernvirus und Infektionsmodell

(A) Das rekombinante Masernvirusgenom besteht aus einer GFP Gensequenz am 3' Strang, gefolgt von den Gensequenzen für die Strukturproteine Nucleocapsid (N), Phosphoprotein (P), den beiden nicht-strukturgebenden Proteinen C und V, dem Matrixprotein (M), Fusionsprotein (F), dem Nager-adaptierten Hämagglutinin (H) und der Polymerase (L) am 5' Ende (Abbildung aus Duprex et al. J Virol 1999). (B) Der Infektionsverlauf lässt sich in zwei Phasen unterteilen, der akuten Phase, gekennzeichnet durch eine hohe Viruslast und der persistenten Phase mit einer geringen Viruslast. Die akute Phase wurde an Tag 7 nach Infektion analysiert, die Persistente dagegen an Tag 28 nach Infektion. Abbildung aus Schubert et al., J Gen Virol 2006 ¹³⁴.

Die Infektion verläuft in Mäusen im Wesentlichen asymptomatisch ohne die beim Menschen typischen Hautkzeme. In der Akutphase der Infektion repliziert das Virus stark, sichtbar an einer hohen Viruslast, und es kommt zur Infektion von Neuronen in beiden Hirnhälften. Durch die induzierte Immunantwort wird das Virus größtenteils beseitigt, es kann allerdings nicht vollständig eliminiert werden. In der persistenten Phase ist die Viruslast gering, aber es gibt nach wie vor noch infizierte Neuronen.

Diese chronische Phase im murinen Infektionsmodell ähnelt der Situation in Kindern mit einer persistenten Masernvirusinfektion vor Ausbruch der SSPE Erkrankung im Menschen.

1.8. Interaktionen von Viren und Sphingomyelinasen

Das gewählte Maserninfektionsmodell ist zum einen interessant durch seine Treg-Sensitivität, zum anderen beeinflussen sich Sphingomyelinasen und Viren gegenseitig. Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit Masernviren (siehe Seite 26) einen Einfluss auf den Sphingomyelin-Stoffwechsel hat, welcher wiederum die MV-Aufnahme verstärkt. Die Bindung von Masernviren an DC-SIGN auf Dendritischen Zellen aktiviert die NSM/Nsm und ASM/Asm. Infolgedessen kommt es zur Akkumulation von Ceramid und der Generierung von Membranplattformen, was eine Rekrutierung und Konzentrierung von Rezeptoren in der Plasmamembran zur Folge hat ²⁰. Der Maserneintrittsrezeptor CD150 befindet sich gemeinsam mit der ASM/Asm in intrazytoplasmatischen, lysosomalen Kompartimenten. Die DC-SIGN-abhängige Aktivierung der ASM/Asm führt zu einer transienten Rekrutierung von CD150 auf die Zellmembran. Dadurch kommt der Rezeptor DC-SIGN, wichtig für die Masernvirenbindung, und der Eintrittsrezeptor CD150 innerhalb der gebildeten Mikromembrandomäne in direkte Nähe zueinander. Letztendlich kommt es dadurch zu einer verstärkten Masernvirenaufnahme in die Zelle ²⁰.

Die Zusammensetzung der Membran und die Verteilung von Rezeptoren spielt generell eine Rolle beim Viruseintritt in die Zelle. Aktivierte Sphingomyelinasen können eine HIV (Humane Immundefizienz-Virus) Infektion unterbinden, indem sie zwar die Bindung des Virus an die Zelle zulassen, aber die Fusion des Virus mit der Zelle inhibieren ³⁵. Der zugrunde liegende Wirkmechanismus ist eine Veränderung in der CD4 Clusterbildung, was zu einer Einschränkung der lateralen Diffusion von CD4 führt. Diese ist jedoch notwendig damit CD4, gp120 und die Korezeptoren CXCR4 oder CCR5 aneinander binden und somit eine Fusion des HI Virus mit der Zelle ermöglichen ³⁵.

1.9. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bedeutung der sauren Sphingomyelinase für die Funktion von T-Zellen und insbesondere regulatorischen T-Zellen tiefergehend zu untersuchen. Daher wurde im ersten Teil der Arbeit die unterschiedliche Aktivierung der sauren Sphingomyelinase in Treg Zellen im Vergleich zu Tconv Zellen, sowie die Lipidzusammensetzung dieser Zelltypen erforscht. Im nächsten Schritt wurde dann die Funktion der Treg Zellen in Asm-defizienten Tieren näher analysiert. Dort ist die Frequenz der regulatorischer T-Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen deutlich erhöht. Aufgrund dessen wurde weiterhin geprüft, ob sich durch pharmakologische Inhibition der Asm ein positiver therapeutischer Effekt auf die Anzahl regulatorischer T-Zellen nachweisen lässt.

Im letzten Teil der Arbeit wurden im *in vivo* Masernvirusmodell die Effekte der Asm Defizienz/Inhibition in T-Zellen näher inspiziert. Dafür wurde die Rolle des Sphingolipidmetabolismus bei der Kontrolle der akuten und persistenten Maserninfektion untersucht. Der Vorteil dieses *in vivo* Modells ist dessen Treg Sensitivität, weil die Viruslast direkt mit der Anzahl an Treg Zellen in den infizierten Tieren korreliert. Wie zuvor gezeigt werden konnte, führt eine Erhöhung der Treg-Frequenz durch Stimulation mit anti-CD28 superagonistischen monoklonalen Antikörpern zu einer transienten Immunsuppression und einer daraus resultierenden verstärkten Virusreplikation und Ausbreitung. Dagegen führte eine Depletion der Treg Zellen zu einer Reduktion der persistenten Infektion¹¹².

2. Material

2.1. Biochemische Reagenzien

Amitriptylin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Benzonase	Novagen (Darmstadt)
Collagenase	SERVA Electrophoresis (Heidelberg)
DABCO	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Desipramin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Diphtherietoxin	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
Foren (Wirkstoff Isofluran)	CP-Pharma (Burgdorf)
HBSS	Biowest (Nuaille, Frankreich)
Proleukin ® (rekomb., humanes IL-2)	Novartis (Basel, Schweiz)

2.1.1. Chemikalien

Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis (Heidelberg)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxid	AppliChem (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Ferak (Berlin)
Eisessig	AppliChem (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem (Darmstadt)
Glycerol	AppliChem (Darmstadt)
Glycin	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	A. Hartenstein (Würzburg)
Kaliumhydrogencarbonat	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Ferak (Berlin)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Ferak (Berlin)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Ferak (Berlin)
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Ferak (Berlin)
Natriumazid (NaN ₃)	AppliChem (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH)	Ferak (Berlin)
Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃)	AppliChem (Darmstadt)

Natrium-Taurocholate	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Neutralrot	Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt)
Percoll	GE Healthcare (Freiburg)
Pluronic F-127	VWR (Darmstadt)
Rinderserumalbumin (BSA)	AppliChem (Darmstadt)
Tris	AppliChem (Darmstadt)
Tween®20	Roth (Karlsruhe)

2.1.2. Farbstoffe und Kits

di-4-ANEPPDHQ (ANEP)	Invitrogen (Carlsbad, Canada)
Annexin V APC	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD4 Isolationskit	MiltenyiBiotec (bergisch Gladbach)
	Affimetrix (Santa Clara, Kalifornien)
Foxp3 Staining Kit	eBioscience
Perm/Wash-Puffer	Becton Dickinson (Heidelberg)
Zellproliferationsdye (eFluor 670)	eBioscience (Frankfurt am Main)

2.2. Antikörper

Spezifität	Konjugat	Klon	Isotyp	Hersteller	Verdünnung
CD3	PerCp	145-2C11	armenischer Hamster IgG	Biologend	1:100
CD4	BV 421	GK1.5	Ratte IgG2b, κ	Biologend	1:1500
CD8b	Alexa 700	YT5156.7.7	Ratte IgG2a, κ	Biologend	1:100
CD8	PerCp	53-6.7	Ratte IgG2a, κ	Becton Dickinson	1:50
CD19	FITC	1.D3	Ratte IgG2a, κ	Biologend	1:100
CD25	PE-Texas-Red	PC-61	Ratte IgG1	eBioscience	1:250
CD25	PE	7D4	Ratte IgMκ	Miltenyi	1:40
CD44	FITC	IM7	Ratte IgG2b, κ	Becton Dickinson	1:100
CD45	BV 510	30-F11	Ratte IgG2b, κ	Biologend	1:1500
CD152 (CTLA-4)	PE	UC10-4B9	Armenischer Hamster IgG	Biologend	1:50 (1:100 Kultur)
CD152 (CTLA-4)	PE-Cy7	UC10-4B9	Armenischer Hamster IgG	Biologend	1:250
T-bet	Perp-Cy5.5	4B10	Maus IgG1, κ	eBioscience	1:100
CD62L	PE	MEL-14	Ratte IgG2a, κ	Becton Dickinson	1:100
Ki67	PE	B56	Maus IgG1, κ	Becton Dickinson	1:200
Foxp3	APC	3G3	Maus IgG1κ	Miltenyi	1:50
MV Pro5 MHC Pentamer	PE	H-2Db RIVINREHL		Proimmune	1:20

2.3. Geräte

Analysenwaage	A. Hartenstein (Würzburg)
Biofuge pico	Heraeus (Gera)
Brutschrank	Heraeus (Gera)
Elektrophoresekammern	VIM (Würzburg)
FACS Aria III	Becton Dickinson (Heidelberg)
FACS Calibur	Becton Dickinson (Heidelberg)
FACS LSR II	Becton Dickinson (Heidelberg)
Fluoreszenzmikroskop	Aristoplan Leitz (Wetzlar)
Homogenisator	A. Hartenstein (Würzburg)
Lichtmikroskop	Leica Microsystems (Wetzlar)
Magnetrührer	IKA.-Labortechnik (Staufen)
Multipipette Discovery	HTL (Warszawa, Polen)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Präparationsbesteck	A. Hartenstein (Würzburg)
Schlauchpumpe	MS-Reglo Ismatec SA (Glattbrugg, Schweiz)
Stahlsiebe	VIM (Würzburg)
Stepper	Tridak (Torrington, USA)
Sterilwerkbank	Heraeus (Gera)
Neubauer Zählkammer	A. Hartenstein (Würzburg)
Tischzentrifuge	Heraeus (Gera)
Ultrazentrifuge	
Sorvall Discovery 90SE	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Vibrator	Leica (Wetzlar)
Vortex VTX-3000L	A. Hartenstein (Würzburg)
Wasserbad	A. Hartenstein (Würzburg)
Zentrifuge	Hettich (Tuttlingen)
Zellschaber	A. Hartenstein (Würzburg)

2.4. Lösungen, Puffer und Medien

Lösungen

ATV

137 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM Glucose, 7 mM NaHCO₃, 0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l Versene, pH=7,4

BSS (Balanced Salt Solution I, II)

BSS I: 50 g Glucose, 3 g KH₂PO₄, 11,9 g Na₂HPO₄, 0,5 g Phenolrot ad 5 l H₂O dest

BSS II: 9,25 g CaCl₂, 20 g KCl, 320 g NaCl, 10 g MgCl₂, 10 g MgSO₄ ad 5 l H₂O dest

125 ml BSS I mit 125 ml BSS II mischen ad 1 l H₂O dest.

BSS/BSA:

BSS Lösung mit 0,2 % BSA

Kochsalzlösung

1,8 % NaCl: (1,8 g NaCl auf 1l H₂O dest.)

0,9 % NaCl (0,9 g NaCl auf 1l H₂O dest.)

HMU-PC: 6-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl-phosphorylcholine

(HMU-PC von Moscerdam, Lagerung -80°C, auftauen bei 37°C)

10 mg HMU-PC in 12,5 ml 250 mM Natriumacetat mit 0,2 % Natrium-Taurocholate bei 56°C auflösen

Mowiol

2,4 g Mowiol 4-88, 6 g Glycerol und 6 ml H₂O auf Magnetprüher 1-2 h mischen; Zugabe von 12 ml 0,2M Tris-HCl pH=8,5; Inkubation bei 50°C 10 min; danach bei 4.000 g, 20°C für 15 min zentrifugieren; Überstand mit 2,5 % DABCO versetzen und bei 37°C lösen

4 % Paraformaldehyd

20 g PFA in 50 ml H₂O und 400 µl 10 N NaOH bei 70°C lösen; mit PBS auf 0,5 l auffüllen; bei 4°C lagern

Trypanblau:

0,04 % Trypanblau mit 0,05 % Natriumazid in PBS

Puffer

Asm Assay Substratpuffer

250 mM Natriumacetat Lösung ansetzen, abpuffern mit Essigsäure (20 %), einstellen auf pH 5,2, frisch EDTA zugeben auf eine finale Endkonzentration von 1,3 mM

Asm Assay Lysepuffer

Asm-Substratpuffer mit 0,2 % Natrium-Taurocholat

Asm Assay Stopplösung

0,2 M Glycin, 0,2 M NaOH, 0,25 % Triton X in H₂Odest, einstellen auf pH 11

Dissoziationspuffer

23 mM CaCl₂, 50 mM KCl, 42 mM MgCl₂, 153 mM NaCl

FACS-Puffer

1 l PBS mit 0,1 % BSA, 0,2 g Natriumazid

PBS (Phosphat-gepufferte Saline)

138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,9 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, pH=7,4 einstellen

PBBS

123 mM NaCl, 4,3 mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 1,3 mM, CaCl₂, 1 mM MgCl₂ x 6H₂O; 0,8 mM MgSO₄ x 7H₂O, 5mM Glucose, 1 % Phenolrot

6x DNA Ladepuffer

6x 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerol in H₂O

TAC-Puffer

20 mM Tris, 0,83 % NH₄Cl, pH 7,2, autoklaviert

TAE-Puffer

50x 2 M Tris, 5,71 % Eisessig, 0,05M EDTA, pH=8,0

Medien

MEM und MEM 2x

Zusammensetzung nach Eagle und Levine, 1967

Mausmedium

RPMI 1640 Medium (Gibco) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin

2.5. Software

FlowJo v8.8.7	FACS Daten Analyse Programm
Graphpad Prism	Statistiksoftware
Mendeley	Literaturverwaltungssoftware
ZEN2012	Konfokalmikroskopie
Mass Hunter Agilent Technologies	Massenspektroskopie

2.6. Verbrauchsmaterial

Einmal-Spritzen BD Plastikpack	A. Hartenstein (Würzburg)
Deckgläser	A. Hartenstein (Würzburg)
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg)
15ml/50ml Greiner Falcon	bio-one (Frickenhausen)
Glasware	VIM (Würzburg)
Kanülen	A. Hartenstein (Würzburg)

LD- und LS- Säulen	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Mikrotiter-Röhrchen	A. Hartenstein (Würzburg)
Mikrotiterplatte (96-Well U-Boden)	Greiner Labortechnik(Frickenhausen)
Nylonsieb 70 µm	Becton Dickinson (Heidelberg)
Objektträger	A. Hartenstein (Würzburg)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Petrischalen	Greiner Labortechnik (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	A. Hartenstein (Würzburg)
UZ-Röhrchen Seton	Beranek Laborgeräte (Weinheim)
Zellkulturflaschen	greiner bio-one (Frickenhausen)
Zellschaber	A. Hartenstein (Würzburg)

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Gewinnung von Milz- und Lymphknotenzellen

Zu analysierende Mäuse wurden mittels CO₂ getötet und der eingetretene Tod durch Überprüfen der Vitalreflexe (Zwischenzehreflex, Lidschlussreflex) bestätigt. Die Mäuse wurden anschließend in Rückenlage fixiert und mittels eines Längsschnittes und seitlichen Entlastungsschnitten aufpräpariert. Anschließend wurden zervikale, axilläre, inguinale und mesenterische Lymphknoten sowie Milz entnommen und in kaltem BSS/BSA aufbewahrt. Die Lymphknoten wurden entweder separat aufgearbeitet oder gepoolt. Die Organe wurden mit einer Pinzette in Nylonsiebe (40 µm) in BSS/BSA-gefüllten Petrischalen überführt und mit dem Stempel einer 20 ml Spritzen zerrieben. Die Zellsuspension wurden in Greiner Röhrchen überführt, bei 190g für 5 Minuten zentrifugiert und abschließend in einem angemessenem Volumen BSS/BSA oder Mausmedium (10 % FCS-haltigem RPMI Medium) aufgenommen. Bei Milzzellen wurden die Erythrozyten mittels hypoosmotischem Schock depletiert. Dazu wurden auf dem Vortexer 3 ml ddH₂O zu den pelletierten Milzzellen zugegeben. Dieses bringt die Erythrozyten durch den osmotischen Druck zum Platzen. Durch sofortige Zugabe von 3 ml 1,8 %iger NaCl-Lösung wurde das Präparat ins isotonische Gleichgewicht gebracht.

3.1.2. Gewinnung von T-Zellen aus dem Gehirn mittels Percollgradienten

Für die Isolation von T-Zellen aus dem Gehirn wurde dieses präpariert (Präparation siehe 3.3.5), in ein Stahlsieb überführt und mittels Spritzenstempel in PBBS zerrieben. Die Zellsuspension wurde mit PBBS gewaschen und bei 170g und 10°C für 10 min zentrifugiert. Für den Verdau wurde das Pellet in einer Lösung aus Dissoziationspuffer (1,4 ml) mit 50 U Benzonase und 0,4 U Collagenase aufgenommen und bei 37°C unter gelegentlichem Schwenken für 1 Stunde inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde das Gehirnpellet in 10 ml isotonischem Percoll der Dichte 1,088 g/ml resuspendiert und in ein frisches 50 ml Falcon überführt. Mit Hilfe einer Metallnadel und Spritze wurde die Zellsuspension mit 5 ml isotonischem Percoll der Dichte 1,112 g/ml unterschichtet. Anschließend wurden die vorhandenen Schichten nacheinander mit je 9 ml isotonischem Percoll der Dichten 1,078 g/ml, 1,05 g/ml und 1,03 g/ml und PBBS vorsichtig überschichtet. Der Percollgradient

wurde für 45 min bei 1500g, 20°C und ohne Bremse zentrifugiert. Lymphozyten wurden von der 1,088-1,078 g/ml Interphase und von der 1,078-1,05 g/ml Interphase abgenommen, einmal mit 40 ml PBBS gewaschen und in 10 % FCS-haltigem RPMI Medium aufgenommen.

3.1.3. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer und 0,04 %iger Trypanblaulösung bestimmt. Dafür wurden die Zellen 1:10, 1:5 oder 1:2, je nach Zellmenge, in Trypanblau verdünnt und 10 µl der Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer überführt. Gezählt wurden nur die lebenden, hellleuchtenden Zellen, aber nicht die blaugefärbten, toten Zellen. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension wurde mit der folgenden Formel berechnet:

gezählte Zellzahl im 16er Quadrat x Verdünnungsfaktor x Kammerfaktor ($1 \cdot 10^4$)

3.1.4. Zellaufreinigung

Aufreinigung mittel MACS Methode

Für die Aufreinigung von Treg und Tconv Zellen wurden zunächst CD4⁺ T-Zellen mittels CD4 Negativ-Isolationskit von Miltenyi bzw. Affymetrix nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die gewonnenen CD4⁺ Zellen wurden auf $2 \cdot 10^7$ /ml in BSS/BSA eingestellt und mit anti-CD25 PE Antikörper (Miltenyi, 1:40) für 15 min bei 4°C gefärbt, gewaschen und mit 10 µl pro $1 \cdot 10^7$ Zellen anti-PE magnetischen Microbeads (Miltenyi,) für 15 min bei 4°C markiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in einem Volumen von 1 ml BSS/BSA aufgenommen, auf vorbereitete LS-Säulen (Miltenyi, LS =“Separation“) gegeben und anschließend dreimal mit je 3 ml BSS/BSA gespült. Im Durchfluss enthalten sind Tconv Zellen, in der Säule dagegen verbleiben die mit magnetischen Beads-markierten CD25⁺, Treg Zellen. Diese wurden anschließend außerhalb des Magneten mit 5 ml BSS/BSA ausgespült. Für eine verbesserte Reinheit wurden die Treg Zellen nochmals über eine LS Säule und die Tconv Zellen über eine LD-Säule (Miltenyi, LD= „Depletion“) gegeben. Der Reinheitsgrad wurde mittels FACS-Färbung verifiziert und betrug ca. 95 % bei den Tconv Zellen und 85 % bei den Treg Zellen.

Aufreinigung mittels FACS-basierter Zellsortierung

Wie zuvor wurden zunächst CD4⁺ T-Zellen mittels CD4-Negativ-Isolationskit von Miltenyi bzw. Affymetrix nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die resultierenden CD4⁺ Zellen wurden auf 2*10⁷ Zellen/ml in 10 % FCS-haltigem RPMI Medium eingestellt und mit anti-CD4 Pacific Blue (1:300) und anti-CD25 APC (1:200) Antikörper für 15 min bei 4°C gefärbt, gewaschen, in 10 % FCS-haltigem RPMI Medium aufgenommen und am FACS Aria III anhand der Marker in die Fraktionen CD4⁺ CD25⁻ und CD4⁺ CD25⁺ aufgeteilt. Im Gegensatz zum Durchflusszytometer, mit dem Fluoreszenzantikörper-markierte Zellen nur dargestellt werden können, können Zellen mit dem FACS Aria III mittels Sortierelektronik getrennt werden. Dazu werden die Zellen in Flüssigkeitstropfen elektrostatisch aufgeladen und je nach Ladung in verschiedene Zielröhrchen abgelenkt.

3.1.5. Massenspektroskopische Analysen

Für die Lipidanalysen wurden 1,5*10⁶ FACS-aufgereinigte Treg und Tconv Zellen in 500 µl Methanol aufgenommen, im Eppendorfgefäß mit flüssigen Stickstoff schockgefroren und auf Trockeneis zur externen Analyse bei AG Kleuser geschickt. Bei der Lipidextraktion wurden C17 Ceramid und C16-31 Sphingomyelin als interne Standards verwendet. Die Probenanalyse erfolgte mittels hochauflösender Flüssigchromatographie-MS/MS im Q-TOF 6530 Massenspektroskop, eingestellt auf den positiven ESI Modus. Die Ceramid Vorläuferionen: (C16-Ceramid (m/z 520.508), C17- Ceramid (m/z 534.524), C18- Ceramid (m/z 548.540), C20- Ceramid (m/z 576.571), C22- Ceramid (m/z 604.602), C24- Ceramid (m/z 632.634), C24:1-Ceramid (m/z 630.618)) wurden in das Fragment m/z 264.270 Ion gespalten. Die Sphingomyelin Vorläuferionen: (C16- Sphingomyelin (m/z 703.575), C16-d31-Sphingomyelin (m/z 734.762), C18- Sphingomyelin (m/z 731.606), C20- Sphingomyelin (m/z 759.638), C22- Sphingomyelin (m/z 787.669), C24- Sphingomyelin (m/z 815.700), C24:1- Sphingomyelin (m/z 813.684)) wurden entsprechend in das Fragment m/z 184.074 gespalten. Die Quantifikation erfolgte mit der Software Mass Hunter (Agilent Technologies).

3.1.6. Einbau von Ceramiden und Clickreaktion

Gesamtlymphknotenzellen ($1 \cdot 10^7$) aus WT oder *Asm*^{-/-} Mäusen wurden mit N₃-C₆-Ceramid (25 µM Endkonzentration, 10 mM Stockkonzentration) in HBSS Medium mit Pluronic F-127 (20 % in DMSO) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch das Ceramid in die Membranen eingebaut wurde. Zur Kontrolle wurden Zellen nur in HBSS inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde bei Raumtemperatur für 10 Minuten die Clickreaktion mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488 DIBO Alkyne (20 µM; Life Technologies) durchgeführt. Für eine Kofärbung wurde CD25 APC parallel mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488 DIBO gefärbt. Danach wurden die Zellen dreimal mit HBSS gewaschen und für die Mikroskopie auf einen 12-Well Objektträger aufgetragen. Für die Mikroskopie wurden konfokale Aufnahmen am LSM 780 Konfokalmikroskop (ausgestattet mit 40x Plan-Apochromat Öobjektiv) unter Nutzung der Laser 404 nm, 488 nm und 633 nm erstellt. Diese Bilder wurden mit dem Programm ZEN2012 für Konfokalmikroskopie verarbeitet und ausgewertet.

Für eine Quantifizierung wurden die Proben in FACS-Röhrchen überführt und am FACS gemessen. Im Fall der FACS-Analyse wurden die Zellen mit den FACS-Antikörpern anti-CD4 brilliant violet 421 (1:1000) und anti-CD25 APC (1:100) und optional anti-CD44 PE (1:100) kofärbt. Besonders wichtig für die FACS-Analyse ist die Unterscheidung von toten und lebenden Zellen, da die toten Zellen stark unspezifisch mit dem DIBO Farbstoff angefärbt werden. Daher wurden die Zellen zusätzlich mit dem Lebend-Tot-Farbstoff V780 gefärbt. Bei der FACS-Analyse wurden die Zellen mittels Gating in CD4⁺ CD25⁺ Treg Zellen, CD4⁺ CD25⁻ CD44⁻ naive Tconv und CD4⁺ CD25⁻ CD44⁺ Effektor-Tconv Zellen eingeteilt.

3.1.7. Asm Aktivitätsassay

Wie oben beschrieben (3.1.4), wurden Tconv und Treg Zellen aufgereinigt. Für die Stimulation der Asm wurden T-Zellen ($1 \cdot 10^6$) mit 1 µg/ml anti-Maus CD28 Antikörper (Klon 37.51) für 20 Minuten auf Eis vorinkubiert. Die Aktivierung erfolgte durch Quervernetzung der CD28 Moleküle durch anti-Maus IgG, gebunden auf vorgecoateten 48-Well Platten (25µg/ml anti-Maus IgG gecoatet für 1 Std bei 37°C). Dazu wurden die anti-CD28-gebundenen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (45, 30, 20, 10 Minuten) nacheinander auf die Platte überführt, bei 37°C inkubiert und zum Abstoppen der Stimulation zum Zeitpunkt Null auf Eis überführt. Anschließend

wurden die T-Zellen in 200 µl Asm Lysepuffer aufgenommen und durch wiederholtes Einfrieren im Methanol/Trockeneis Bad und Auftauen im 37°C Wasserbad lysiert (4-5 Zyklen). Zum Entfernen der Zellkerne wurden die Zellfragmente für 5 Minuten bei 560g (4600 rpm) in der Eppendorf Zentrifuge (4°C) zentrifugiert, die Überstände mit den Zellmembranen in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und mit Asm-Puffer aufgefüllt. Für die Membranisolation wurden die Lysate für 1 Std bei 90838g (26000rpm) in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Membranpellets in 40 µl Asm-Lysepuffer aufgenommen. Je 10 µl Lysat wurden mit 10 µl Asm-Lysepuffer, 1,3 µl 30 mM EDTA und 10 µl 1,35 mM HMU-PC (6-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl-phosphorylcholine), ein Sphingomyelin-ähnliches Substrat, zusammengegeben und für 17 Std bei 37°C inkubiert (angesetzt als Triplikate, Negativkontrolle ohne Lysat). Am nächsten Tag wurde die Reaktion mit 200 µl Stopplösung beendet und in schwarze Mikrotiterplatten zur Analyse am Fluoreszenzmessgerät überführt. Die membrangebundene Asm spaltet über Nacht das HMU-PC zu einem fluoreszierenden Produkt, welches am Fluoreszenzmessgerät bei einem Extinktionswert von 404 nm und Emissionswert von 460 nm gemessen werden kann. Die Stärke der Fluoreszenz korreliert mit der umgesetzten Menge des Substrats und zeigt somit die Asm Aktivität an.

3.1.8. Bestimmung der Serumkonzentration von Amitriptylin und Nortriptylin

Um den Erfolg der Behandlung der Mäuse mit Amitriptylin über i.p. Gabe zu überprüfen wurde die Konzentration von Amitriptylin im Serum bestimmt. Um festzustellen, ob Amitriptylin auch entsprechend verstoffwechselt wurde, wurde zusätzlich die Konzentration des Metabolits Nortriptylin analysiert. Dafür wurde den Mäusen mittels Herzpunktion Blut entnommen. Für die Serumgewinnung wurde das Blut 30 Minuten bei 2200g in der Biofuge Pico von Heraeus zentrifugiert. Durch die Zentrifugation kann das Serum im Überstand abgenommen werden. Anschließend wurde von Herrn Burger aus der Psychiatrie die Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Amitriptylin und Nortriptylin wurden mittels HPLC-Methode aufgetrennt und über UV-Detektion quantifiziert. Dafür wurden die Stoffe zunächst über eine Festphase mittels Säulenschaltung extrahiert und anschließend über eine analytische Säule aufgetrennt. Durch Erstellung einer Eichgerade konnte die Konzentration bestimmt werden.

3.1.9. Viruszucht, Virusaufreinigung und Titerbestimmung

Das verwendete rMV^{E_{dt}ag}eGFP-CAMH Virus wurde auf Vero Zellen gezüchtet. Vero Zellen stammen aus einer 1962 etablierten Zelllinie von Nierenepithelzellen einer Grünen Meerkatze. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit in 10 %igem FCS-haltigem MEM Medium. Die Zellen wachsen als adhärenente Einzelzellschicht und werden bei 90-95 % Konfluenz nach Ablösen mit ATV in neue Zellkulturflaschen aufgeteilt (das Splitten der Vero Zellen erfolgte 2-3x wöchentlich).

Für die Virusvermehrung wurden Verozellen bei 60-70 %iger Konfluenz mit einer MOI von 0,01 (Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle) für 2 Stunden unter mehrfachem Schwenken infiziert, danach wurde das Virus abgenommen und die so erhaltenen Zellen für 2-3 Tage im Brutschrank inkubiert. Das Fortschreiten der Infektion wurde mittels Mikroskop überprüft. Bei maximaler Synzytienbildung (das Verschmelzen mehrerer infizierter Zellen) wurde das Medium auf 2 ml reduziert. Die Kulturflasche wurde bei -80°C eingefroren, um ein Platzen der Zellen zu induzieren. Im Anschluss ließ man die Flasche langsam bei 4°C auftauen, löste die Zellen mittels Zellschaber und poolte die Lysate mehrerer Flaschen in einem 50 ml Greiner Falcon. Um zellgebundenes Virus zu lösen, wurden die Lysate zusätzlich in einen Homogenisator (Douncer) gegeben und mehrfach durch Auf- und Abbewegung des Stempels homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden bei 4430g (4500U/min), bei 10°C für 15 min pelletiert und der virushaltige Überstand in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C gelagert. Um die Viruskonzentration zu bestimmen, wurde ein sogenannter Plaque-Assay durchgeführt. Für diesen wurden die durch Infektion entstehenden Plaques/Löcher in einer Einzelzellschicht ausgezählt. Hierfür wurden in eine 6-Well Platte $1,5 \cdot 10^5$ Verozellen/Well ausgesät und am nächsten Tag mit verschiedenen Stufen einer Verdünnungsreihe der Viruspräparation (10^{-2} - 10^{-7}) infiziert. Nach 2 Stunden Infektion wurde die Virusverdünnung abgenommen und die Zellen mit einer Overlay-Mischung (Agar-Medium-Gemisch) überschichtet. Nach 5 Tagen Inkubation im Brutschrank wurde die Anzahl der Plaques nach Neutralrot-Färbung (Anfärben lebender Zellen) ausgezählt. Die Anzahl der Plaques ergab den Faktor und die Verdünnungsstufe die Potenz der Viruskonzentration, z. B. 2 Plaques bei der Verdünnung 10^{-6} ergibt einen Virustiter von $2 \cdot 10^6$ pfu/ml.

3.2. *In vitro* Kulturen

3.2.1. Suppressionsassay

Gepoolte Lymphknotenzellen und Milzzellen wurden mit anti-CD25 PE Antikörpern und anti-PE beads markiert (siehe Zellaufreinigung) und über eine LD Säule gegeben. Die nichtmagnetische Fraktion; bestehend aus konventionellen T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen, wurde in einem zweiten LD Säulen Schritt weiter aufgereinigt und anschließend mit dem Zelldivisionsfarbstoff eFluor 670 markiert. Dafür wurden die Zellen in Protein-freiem Medium (BSS) entsprechend einer Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen aufgenommen. Der Farbstoff eFluor 670 wurde mit einer Konzentration von 5 μ M separat in gleich viel Volumen BSS angesetzt. Unter starkem Vortexen wurde die Färbelösung der Zellsuspension zugegeben, wodurch eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffs gewährleistet war und bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von kaltem, protein-haltigem Medium (BSS/BSA) und anschließend wurden die Zellen noch zweimal gewaschen. Die Treg-angereicherte, CD25⁺ magnetische Fraktion wurde am BD FACS Aria III gesortet um CD4⁺ CD25⁺ regulatorische T-Zellen zu erhalten. Für den Suppressionsassay wurden CD4⁺ CD25⁻ konventionelle T-Zellen inklusive Antigen-präsentierender Zellen zusammen mit CD4⁺ CD25⁺ regulatorischen T-Zellen in den Verhältnissen 1:1, 1:2, 1:4, und 1:8 kokultiviert. Je nach Versuch wurden Treg und Indikatorzellen von WT oder Asm^{-/-} Mäusen verwendet. Für die Stimulation der Zellen wurde anti-CD3 monoklonaler Antikörper (5 μ g/ml) hinzugefügt. Nach drei Tagen Kultur bei 37°C wurde die Zellteilung mittels Zellmarkerverdünnung (eFluor 670) analysiert und der Anteil der Suppression mit der Formel $100 \times (\text{Divisionsindex [Tind]} - \text{Divisionsindex [Tind + Tregs]}) / \text{Divisionsindex [Tind]}$ berechnet.

3.2.2. Capture-Assay

CTLA-4 kann aufgrund seiner geringen Oberflächenexpression nur schlecht extrazellulär angefärbt werden. Deshalb wurde das an die Oberfläche transportierte CTLA-4 durch Antikörperfärbung im Capture Assay sichtbar gemacht. Dafür wurden Gesamtlymphknotenzellen in Gegenwart von 25 IU/ml rekombinantem Interleukin-2 (IL-2) kultiviert oder zusätzlich mit anti-CD3 monoklonalem Antikörper (5 ng/ μ l) stimuliert und mittels anti-CTLA-4 PE Antikörper über einen Zeitraum von 0,5, 2, 4 und 24 Stunden markiert. Als Spezifikationskontrolle wurde eine passende PE-

Isotypkontrolle verwendet. Zur Zellklassifizierung wurden die Zellen mit anti-CD4, anti-CD25 und anti-Foxp3 gegengefärbt und bei der Auswertung auf CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ Treg Zellen gegatet. Der MFI (Median der Fluoreszenz) der CTLA-4 PE Färbung gab eine Aussage darüber, wie viele CTLA-4 Moleküle im gewählten Zeitraum an die Oberfläche transportiert wurden und dort angefärbt wurden. Parallel dazu wurde durch intrazelluläre CTLA-4 Färbung die Gesamtmenge an CTLA-4 in der Zelle bestimmt. Daraus konnte das Verhältnis von an die Oberfläche transportiertem CTLA-4 zu gesamtem CTLA-4 gebildet werden. Als Kontrollen dienten Färbungen mit Isotyp Antikörpern mit irrelevanter Spezifität.

3.2.3. *In vitro* Kulturen in Gegenwart von Asm-Inhibitoren

Für die Analyse von Treg-Frequenzen in Abhängigkeit von Asm-Inhibitoren wurden $2 \cdot 10^5$ gesamte oder CD4⁺ Splenozyten aus WT oder Asm^{-/-} Mäusen in 96-Well Rundbodenplatten für drei Tage in 10 % FCS-haltigem RPMI Medium in Gegenwart von Amitriptylin oder Desipramin (0,6 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM und 10 µM) und in An- oder Abwesenheit von IL-2 (0,1 µM oder 1 µM) inkubiert. Um den Wirkmechanismus näher zu analysieren wurden Mischkulturen angefertigt, zusammengesetzt aus CD25⁻ Zellen (Tconv und APCs) aus WT oder Asm^{-/-} Mäusen zusammen mit sortierten Treg Zellen aus WT Mäusen und wie oben behandelt.

3.3. Tierexperimentelle Methoden

3.3.1. Mäuse

Asm^{-/-} (*Smpd1*^{-/-}) C57BL/6 Mäuse stammen von R. Kolesnik (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY) und wurden heterozygot x heterozygot verpaart. Die B6.129(Cg)-*Foxp3*^{tm3(DTR/GFP)Ayr/J} Mäuse¹³⁵ wurden von der Firma Jackson (the Jackson Laboratories) gekauft. Alle Mausstämme wurden unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen in der Tierhaltung des Instituts für Virologie und Immunbiologie Würzburg beziehungsweise des Instituts für Molekulare Biologie Essen gehalten. Die gesamten Tierexperimente wurden im Einklang mit dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und durch die Regierung von Unterfranken genehmigt. Für die Experimente wurden Geschwistertiere mit unterschiedlichen Genotypen verglichen.

3.3.2. *In vivo* Behandlung von Mäusen mit Amitriptylin

C57BL/6 Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zweimal täglich morgens und abends und am dritten Tag morgens mit 0,5 mg Amitriptylin (Dosis ca. 20 mg/kg Körpergewicht), gelöst in 200 µl 0,9 %iger Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert.

Bei den Transferexperimenten wurden am Tag vor Behandlungsbeginn $0,8-1 \cdot 10^7$ CD4⁺ aufgereinigte T-Zellen aus Thy1.1⁺/Thy1.2⁺ Mäusen (Alter 17–20 Wochen) in Asm^{-/-} Mäuse (Alter 4-12 Wochen) intravenöse injiziert. Während der Amitriptylinbehandlung von infizierten Mäusen wurde die Dosis Alters- und Gewichtsabhängig angepasst. Im Alter von 4 Wochen (ca. 15 g) betrug die Dosis 0,25 mg, im Alter von 5 Wochen (ca. 19 g) waren es 0,36 mg und danach wie zuvor 0,5 mg Amitriptylin (ab ca. 23-25 g). Der Behandlungsbeginn war an Tag 14 nach der Infektion und erfolgte zweimal täglich für weitere 14 Tage. Bei der Behandlung von Foxp3-DTR Mäusen wurde die Zeit auf eine Woche, je zweimal täglich verkürzt, beginnend ab Tag 21.

3.3.3. Intrazerebrale Maserninfektion

Mäuse im Alter von 14-17 Tagen beziehungsweise einem Mindestgewicht von 6 g wurden über die Atemluft mit Isofluran narkotisiert und im Nackengriff fixiert. Mit einer 1 ml Tuberkulinspritze, fixiert in einem mechanischen Stepper, wurden die Mäuse intrazerebral mit 2000 pfu rMV^{E_{dt}tag}eGFP-CAMH Virus in 20 µl sterilem PBS injiziert. Die Applikation erfolgte in die linke Hemisphäre des Gehirns, mittig zwischen Auge und Ohr, mit einer Einstichtiefe von 2-3 mm, knapp unterhalb der Schädeldecke.

3.3.4. Depletion regulatorischer T-Zellen in Foxp3-DTR Mäusen

Foxp3-DTR Mäuse tragen eine knock-in cDNA Sequenz bestehend aus dem humanen Diphtherietoxin Rezeptor, fusioniert mit einer Sequenz für GFP (green fluorescent protein) und verbunden mit einer "Ribosomen Eintrittsstelle" (IRES). Das Genkonstrukt steht unter Kontrolle des *Foxp3* Promotors und wird somit nur in Foxp3⁺ Treg Zellen exprimiert. Im Versuch wurden regulatorische T-Zellen in Foxp3-DTR Mäusen durch Gabe von Diphtherietoxin (DT) an Tag 21 und 22 sowie an Tag 24 und 26 nach Infektion depletiert. Dafür wurde den Mäusen intraperitoneal 100 µl einer 0,9 %igen NaCl Lösung mit 500 ng DT beziehungsweise 250 ng DT an den

späteren Zeitpunkten verabreicht. Damit die Belastung für die Mäuse durch die parallel erfolgende Amitriptylin-Behandlung nicht zu groß wurde, wurden die Tiere zeitversetzt behandelt: morgens und abends (9.00 Uhr und 17.00 Uhr) Amitriptylingabe und mittags (ca. 12.00 Uhr) DT-Gabe.

3.3.5. PFA-Perfusion von Mäusen und Präparation der Gehirne

Zur Vorbereitung für histologische Vibratomschnitte und zur besseren Gewebeerhaltung der Mausgehirne wurden die Mäuse vor der Gehirnentnahme mit 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Dabei ist es wichtig, die Lymphknoten und Milz vorher zu entnehmen, da keine Zellisolation aus fixiertem Material möglich ist. Um die Perfusion durchzuführen, wurde der Thorax geöffnet und das Herz freigelegt. Der rechte Vorhof wurde mit Hilfe einer kleinen Schere eingeschnitten, um ein Abfließen von Flüssigkeit zu ermöglichen. Unter Verwendung einer Kanüle (Größe 26G), angeschlossen an eine Schlauchpumpe, wurde die PFA-Lösung über die rechte Herzkammer in den Blutkreislauf der Maus infundiert. Die Perfusion erfolgte für ca. 5 Minuten und der erfolgreiche Verlauf wurde über die Entfärbung der Leber und das Versteifen der Maus sichtbar. Anschließend wurde der Kopf von der Maus getrennt, das Fell entfernt und die Schädeldecke mit einer Schere vorsichtig entlang der Fissura longitudinalis cerebri aufgeschnitten. Entlastungsschnitte rechts und links ermöglichten das Aufbrechen der Schädeldecke, sodass das freigelegte Gehirn mit kleinem Löffel im Ganzen heraus präpariert werden konnte. Anschließend wurde das Präparat für mindestens eine Woche in 4 %iger PFA-Lösung postfixiert.

3.3.6. Anfertigung histologischer Gehirnschnitte mittels Vibratom

Histologische Gehirnschnitte wurden mit Hilfe eines Vibratoms angefertigt. Dabei wurde das Gewebe (ohne vorheriges Einbetten in Paraffin oder Tissue Tek) mittels einer vibrierenden Klinge geschnitten. Dazu wurde mit Hilfe einer Rasierklinge das Kleinhirn mit der Medulla oblongata (verlängertes Mark) abgeschnitten und die so entstandene Schnittfläche zum Befestigen mit Sekundenkleber auf dem Schneideblock benutzt. Der Schneideblock wurde entsprechend der Herstellerangaben im Vibratom eingespannt und die Kammer mit kaltem PBS gefüllt und die Temperatur des Mediums durch Eiskühlung aufrecht gehalten. Vom gekühlten, PFA-fixierten Gehirn konnten nun 50 µm dicke Serienschnitte angefertigt werden. Diese

wurden mit Mowiol beziehungsweise Fluoromount eingedeckt und nach einer Trocknungsphase am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Hierbei wurden die infizierten, GFP-leuchtenden Neuronen ausgezählt.

3.4. Immunologische Methoden

3.4.1. FACS-Analyse

Für die Analyse am Durchflusszytometer wurden die Zellen mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert. Für die FACS-Färbung wurden die zu analysierenden Zellen in eine 96-Well V-Bodenplatte überführt und bei 510 g (1600 rpm) für 3 min pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 25 µl Blockingpuffer aufgenommen, bestehend aus anti-Fcγ Rezeptor II/III monoklonalem Antikörper (Klon 2.4.G2) und FACS-Puffer im Verhältnis 1:5, und für 15 min bei 4°C inkubiert. Zu dieser Lösung wurden 25 µl Antikörperlösung, bestehend aus FACS-Puffer und doppelt konzentrierten Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern, hinzugefügt und für weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Proben mit ausschließlicher Oberflächenfärbung wurden mit FACS-Puffer gewaschen, in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Für intrazelluläre Färbungen (Foxp3, Ki-67, T-bet, CTLA-4) wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung mit PBS gewaschen; anschließend bei Raumtemperatur 30 min lang oder bei 4°C über Nacht fixiert (Fix/Perm Lösung). Nach der Fixierung wurden die Zellen mit Permpuffer (10x Permeabilisierungspuffer, 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt) gewaschen und mit den intrazellulären Antikörpern in Permpuffer für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abschluss wurden die Zellen mit Permpuffer gewaschen und in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen transferiert.

Annexin V ist ein Marker für apoptotische Zellen, es bindet Phosphatidylserin, das im frühen Apoptosestadium auf die Außenseite der Membran gelangt. Bei intakten Zellen befindet sich Phosphatidylserin auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran, sodass Annexin V lebende Zellen nicht anfärben kann. Um apoptotische Zellen zu markieren, wurden die Zellen mit Annexin V für 15 min auf Eis inkubiert und ohne zu waschen, nur mit FACS-Puffer ausverdünnt innerhalb von 30 min am FACS-Gerät gemessen.

Für die Pentamerfärbung, zur Detektion von Masernvirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, war eine Abwandlung des Standard FACS-Protokolls nötig. Die pelletierten Zellen wurden ohne vorheriges Blocken direkt in der Färbelösung aufgenommen, bestehend aus FACS-Puffer, H-2Db RIVINREHL - beladenem MV Pro5 MHC Pentamer, anti-CD45, anti-CD8, anti-CD19 und dem Lebend-Tot-Farbstoff. Die Zellen wurden bei 37°C für eine halbe Stunde inkubiert und nach einem Waschschrift unmittelbar gemessen.

Alle Durchflusszytometrische Analysen wurden am LSR II durchgeführt und mit der Software Flowjo ausgewertet.

3.4.2. Statistische Auswertung

Parametrische Daten wurden entweder mit einem zweiseitigen Students T-Test ausgewertet (2 Gruppen zum Vergleichen) oder mit einem zweiseitigen ANOVA Test (Vergleich mehrerer Gruppen). Nichtparametrische Daten wurden mit dem Mann-Whitney Test analysiert. P-Werte <0,05 wurden als signifikant bewertet (* p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Soweit nicht anders angegeben, sind die Daten als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

4. Ergebnisteil

4.1. Regulatorische T-Zellen zeigten im Vergleich zu konventionellen T-Zellen eine erhöhte Asm Aktivität

Wie anfangs beschrieben wurde die Asm durch CD28 Stimulation aktiviert. CD28 Signale sind ebenfalls wichtig für den Erhalt und die Funktion von regulatorischen T-Zellen. Daher stellte sich die Frage, ob sich Treg Zellen und Tconv Zellen in ihrer Asm Aktivität unterscheiden. Für den Versuch wurden $CD4^+ CD25^+$ regulatorische und $CD4^+ CD25^-$ konventionelle T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen aufgereinigt (Abb. 6A), deren Zellmembranen mittels Ultrazentrifugation isoliert und hinsichtlich ihrer Asm Aktivität analysiert. Im Asm Assay setzt die membranständige Asm ein Sphingomyelin-ähnliches Substrat, das HMU-PC (6-Hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl-phosphoryl-cholin), zu einem fluoreszierenden Produkt um, welches im Fluoreszenzmessgerät gemessen wird. Je höher die Fluoreszenzintensität ist, desto mehr Substrat wurde umgesetzt und desto höher ist die Asm Aktivität.

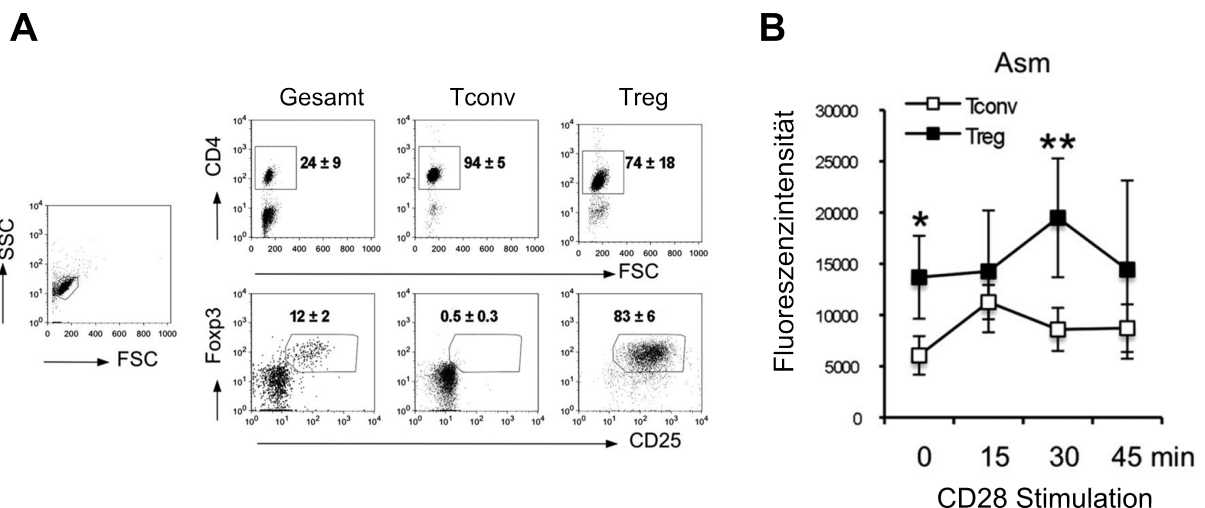


Abb. 6 Erhöhung der Asm Aktivität in regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu konventionellen T-Zellen.

(A) Darstellung der Reinheit der verwendeten MACS-aufgereinigten Treg und Tconv Zellen aus gepoolten Lymphknotenzellen und Milzzellen. Die Zahlenwerte geben den Mittelwert und die Standardabweichung der gewählten Region an (n=4). (B) Basale und CD28-stimulationsinduzierte Asm Aktivität aufgereinigter regulatorischer (schwarze Quadrate) und konventioneller (weiße Quadrate) T-Zellen aus Wildtyp Mäusen. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung aus n=4 Tieren und die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigem Student T-Test berechnet (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001). Erstmalige Veröffentlichung der Daten in Hollmann et al. 2016¹³⁶.

Bereits die basale Asm Aktivität war in regulatorischen im Vergleich zu konventionellen $CD4^+$ T-Zellen erhöht (Abb. 6 B). Nach CD28 Stimulation wiesen Treg

Zellen eine signifikant stärkere und länger anhaltende Asm Aktivierung auf als Tconv Zellen. In Tconv Zellen erreichte die Asm Aktivierung schon nach 15 Minuten ihren Höhepunkt, dieser wurde in Treg Zellen erst nach 30 Minuten erreicht. Danach sanken die Werte wieder auf das Anfangsniveau ab (Abb. 6 B).

4.2. Treg Zellen enthielten mehr Ceramid als naive Tconv Zellen und besaßen eine veränderte Lipidordnung

Eine differenziell regulierte Asm Aktivität lässt vermuten, dass sich die T-Zellen auch hinsichtlich ihres Gehalts an Ceramid, dem Produkt der Asm, unterscheiden. MACS aufgereinigte, unstimulierte Treg und Tconv Zellen wurden mittels Massenspektroskopie hinsichtlich ihres Ceramid und Sphingomyelingehalts analysiert. Es konnten Lipide unterschiedlicher Kettenlänge identifiziert werden, wobei C16, C18 und C24 Lipide am häufigsten vorkamen. Die Verhältnisse der einzelnen Untergruppen der Lipidkettenlängen zueinander war sowohl bei der Ceramid- als auch der Sphingomyelinanalyse zwischen Treg und Tconv Zellen vergleichbar (Abb. 7 A und B). Wie in Abb. 7 B ersichtlich ist, enthielten Treg Zellen signifikant mehr Ceramid als Tconv Zellen, dagegen war der Sphingomyelingegehalt in Treg und Tconv ähnlich (Abb. 7 A). Als nächstes wurden WT und $Asm^{-/-}$ Treg und Tconv Zellen betrachtet. Als Folge der Asm Defizienz enthielten $Asm^{-/-}$ Treg und Tconv Zellen ca. die 7 - 10 fache Mengen an Sphingomyelin im Vergleich zu den entsprechenden WT Zellen (Abb. 7 C), da durch die fehlende Enzymfunktion der Asm das Sphingomyelin nicht mehr in Ceramid umgesetzt wird. Im Gegensatz zum WT variieren Treg und Tconv Zellen aus $Asm^{-/-}$ Mäusen hinsichtlich der Sphingomyelinmenge, d. h. $Asm^{-/-}$ Treg Zellen enthielten mehr Sphingomyelin als Tconv Zellen. Bei der Ceramidmenge verhielten sich $Asm^{-/-}$ Zellen analog zum WT. Treg Zellen hatten die ca. 5 - fache Menge an Ceramid im Vergleich zu den Tconv Zellen (Abb. 7 D). Da wir vermuten, dass der Anstieg des Ceramidgehalts in Treg Zellen im Vergleich zu Tconv Zellen auf einer Asm-vermittelten Spaltung von Sphingomyelin beruht, wurde das Verhältnis von Ceramidmolekülen zu Sphingomyelinmolekülen in der Membran untersucht. In Treg Zellen aus $Asm^{-/-}$ Mäusen kamen auf ein Sphingomyelinmolekül weniger Ceramidmoleküle als auf Treg Zellen aus WT Mäusen (Abb. 7 E).

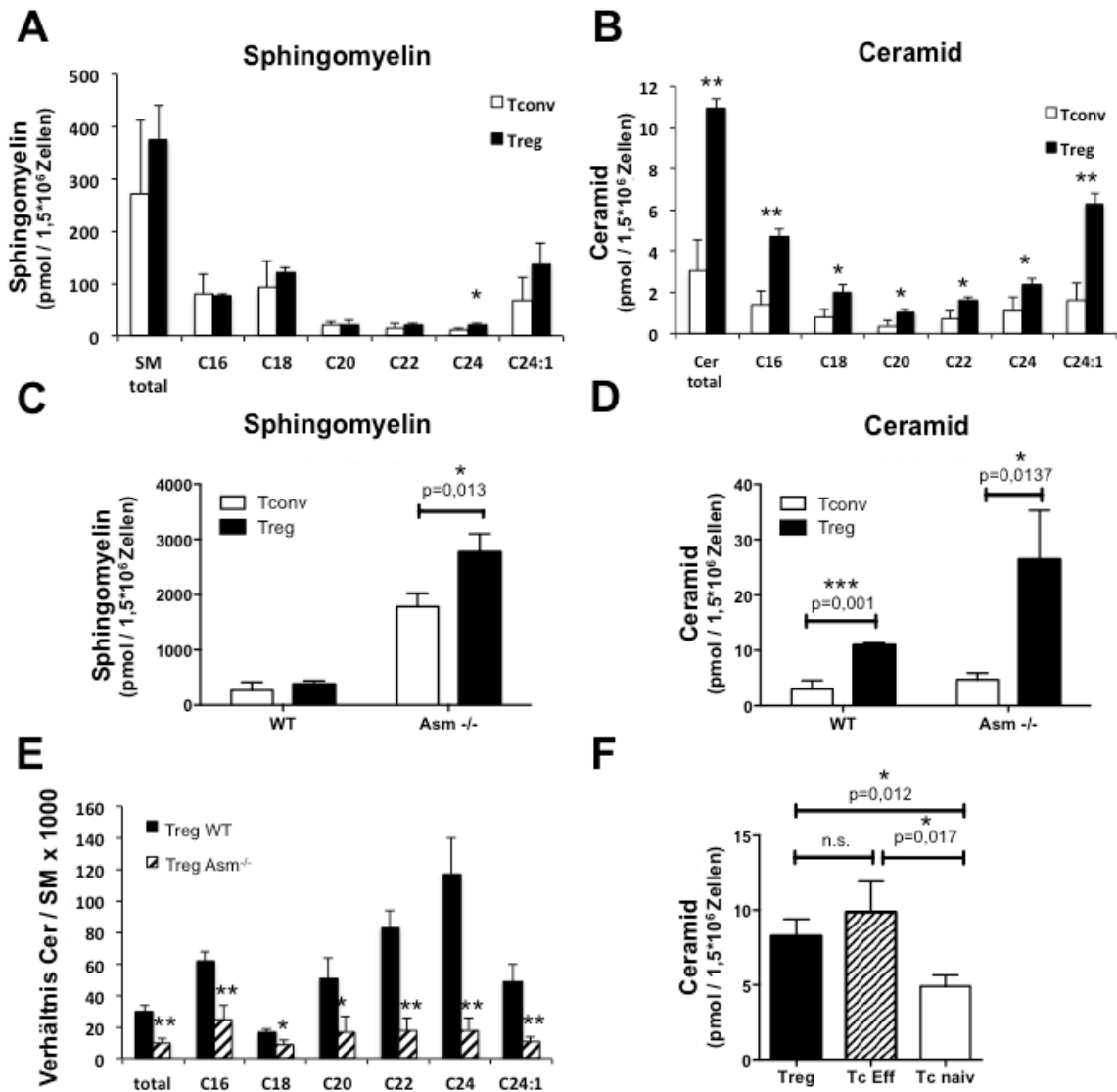


Abb. 7 Erhöhter Ceramidgehalt in Treg Zellen im Vergleich zu Tconv Zellen nach Lipidanalyse im Massenspektroskop.

(A+B) Massenspektroskopische Analyse von (A) Sphingomyelin und (B) Ceramid von unterschiedlicher Kettenlängen in Treg und Tconv Zellen aus WT Mäusen. (C+D) Vergleich von Treg vs. Tconv Zellen aus WT und Asm^{-/-} Mäusen hinsichtlich ihres (C) Sphingomyelingehts und (D) Ceramidgehalts (n=4 Mäuse pro Gruppe). (E) Analyse des Verhältnis von Ceramidmolekülen zu Sphingomyelinmolekülen in der Membran von WT und Asm^{-/-} Treg Zellen. (F) Vergleich von Treg Zellen vs. Effektor-T-Zellen vs. naiven T-Zellen aus WT Mäusen hinsichtlich des totalen Ceramidgehalts (n=3 Mäuse pro Gruppe). Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigem Student T-Test berechnet, signifikante Werte sind mit Sternchen gekennzeichnet (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001). Erstmalige Veröffentlichung der Daten in Hollmann et al. 2016¹³⁶.

Als nächstes wurde analysiert, ob sich die Aktivierung auf den Ceramidgehalt auswirkt. Entsprechend wurden CD44⁻ CD62L⁺ Foxp3⁻ naive und CD44⁺ CD62L⁻ Foxp3⁻ Effektor-T-Zellen¹³⁷, sowie Treg Zellen aus WT Mäusen gegenüber gestellt. Naive Tconv Zellen enthielten signifikant weniger Ceramid als die aktivierten,

antigenerfahrenen Effektor-T-Zellen (Abb. 7 F). Außerdem hatten Treg Zellen ähnlich viel Ceramid wie Effektor-T-Zellen, was Ausdruck des präaktivierten Zustand der Treg Zellen sein könnte. Der Sphingomyelingehalt unterschied sich zwischen naiven und Effektor-T-Zellen, analog zu vorher, nicht (Abb. 7 F und nicht gezeigt Daten).

Die Massenspektroskopische Analyse misst den Ceramidgehalt aller Zellmembranen, inklusive Kernmembranen, da die gesamte Zelle lysiert wurde und davon die Membranen gewonnen wurden. Entscheidend ist aber nicht nur die absolute Menge, sondern auch die Verteilung des Ceramids in der Plasmamembran. Hingegen der Massenspektroskopie wird bei der Click-Chemie nur der Einbau in die Plasmamembran dargestellt. Mit Hilfe der Click-Chemie kann man die Verteilung des natürlichen Ceramides gut widerspiegeln, da sich die clickbaren Ceramide bevorzugt in vorhandene, ceramidreiche Membranregionen einbauen¹³⁸. Die Clickmethode hat gegenüber der klassischen Methoden mit Fluorochrome-markierten Lipiden den Vorteil, dass Lipide mit einer clickbaren Einheit deutlich kleiner sind und bessere polare Eigenschaften haben und sich entsprechend "natürlicher" in die Membran einbauen. Nach entsprechendem Protokoll wurden die Zellen mit clickbarem C₆-Ceramid gefüttert und anschließend mit dem Farbstoff DIBO 488 spezifisch "geclickt"/gefärbt¹³⁸.

Wie in Abb. 8 zu erkennen ist, befand sich das eingebaute Ceramid im äußeren Membranring. Tote und apoptotische Zellen wurden sehr stark und unspezifisch angefärbt. Eine Doppelfärbung mit anderen Markern ermöglicht, den Ceramideinbau von z. B. CD25⁺ Treg Zellen darzustellen. Die quantitative Analyse der "geclickten" Zellen erfolgte im Durchflusszytometer. Dafür wurden die Zellen parallel zum Färbeschritt mit DIBO 488, mit den FACS-Antikörpern anti-CD4, anti-CD25 und optional anti-CD44 gefärbt und mit einem Lebend-Tod-Farbstoff markiert, um die toten, unspezifisch gefärbten Zellen ausschließen zu können. Abb. 8 B zeigt, dass Treg Zellen aus WT und *Asm*^{-/-} Mäusen mehr Ceramid inkorporierten als Tconv Zellen. Effektor-T-Zellen (CD44⁺) verhielten sich wie Treg Zellen und integrierten ebenfalls mehr Ceramid als naive Tconv Zellen. Soweit deckten sich die Ergebnisse mit den massenspektroskopischen Analysen (Abb. 7 F). *Asm*^{-/-} Tconv und Treg Zellen bauten tendenziell weniger Ceramid ein als die entsprechenden Wildtypzellen. Auffällig beim Vergleich von *Asm*^{-/-} Treg zu WT Treg Zellen war, dass sich die

Unterschiede beim Ceramidgehalt (Abb. 7 B) und beim Ceramideinbau (Abb. 8 B) gegenläufig verhielten, was aber darauf beruht, dass einmal alle Zellmembranen (Abb. 7 B) und einmal die äußere Plasmamembran berücksichtigt wurde (Abb. 8 B).

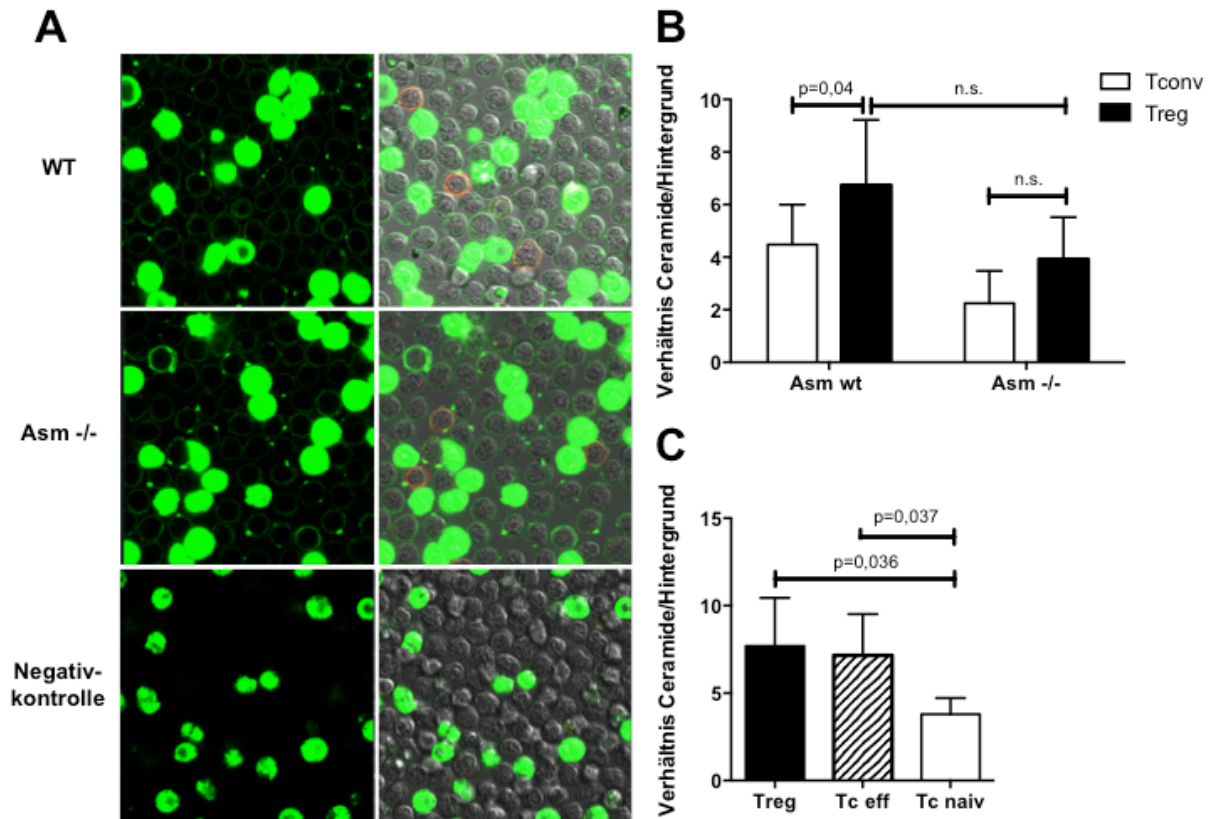


Abb. 8 Erhöhter Einbau von clickbarem Ceramid in Treg Zellen im Vergleich zu Tconv Zellen.

(A) $CD4^+$ Lymphknotenzellen aus WT und $Asm^{-/-}$ Mäusen wurden mit C_6 -Ceramid gefütterten und mit DIBO 488 (grün) geklickt. Um Treg Zellen zu detektieren wurde zusätzlich $CD25$ gefärbt (rot). Dargestellt sind Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop, wobei die linke Spalte die Ceramid geklickten Zellen zeigt und die rechte Spalte das Overlay aus geklickten Zellen, Durchlichtaufnahme und $CD25$ Kofärbung. Tote Zellen sind unspezifisch stark angefärbt. (B) Quantitative Auswertung der geklickten T-Zellen aus WT und $Asm^{-/-}$ Mäusen am FACS, Analyse der $CD4^+ CD25^+$ Treg, $CD4^+ CD25^-$ Tconv Zellen und (C) Analyse der $CD4^+ CD25^+$ Treg, $CD4^+ CD25^- CD44^-$ naive Tconv Zellen und $CD4^+ CD25^- CD44^+$ Effektor-Tconv Zellen aus WT Mäusen. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichung aus $n= 5-8$ Tieren dar. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem Student T-Test, signifikante Werte haben eine p-Wert $p < 0,05$.

Entscheidend für die Funktion von Zellen und deren Aktivierung ist sowohl der absolute Lipidgehalt als auch die Verteilung der Lipide in der Membran. Die Einlagerung des ANE Farbstoffs in die Zellmembran gibt Aufschluss über die Lipidordnung der Zellen^{59,139,140}. Damit können "geordnete" Lipidmembranen von "ungeordneten" Membranen unterschieden werden, da sich der Farbstoff bevorzugt in Membranen mit niedriger Lipidordnung einlagert. Bei cholesterolreichen, geordneten Membranen verschiebt sich überdies das Emissionsspektrum des ANE

Farbstoffs und erleichtert somit die Unterscheidung. In WT Mäusen wiesen ca. die Hälfte der Treg Zellen (46 %) Membranen mit einer niedrigen Lipidordnung auf (ANE positiv), während bei den Tconv Zellen nur etwa 15 % der Zellen eine niedrige Lipidordnung hatten (Abb. 9 A und B). Insbesondere die naiven Tconv Zellen waren vorwiegend ANE negativ und hatten folglich eine hohe Lipidordnung. Die Effektor-Tconv Zellen ähnelten dagegen den Treg Zellen, auch sie hatten einen großen Anteil an Zellen (39 %) mit einer niedrigen Lipidordnung.

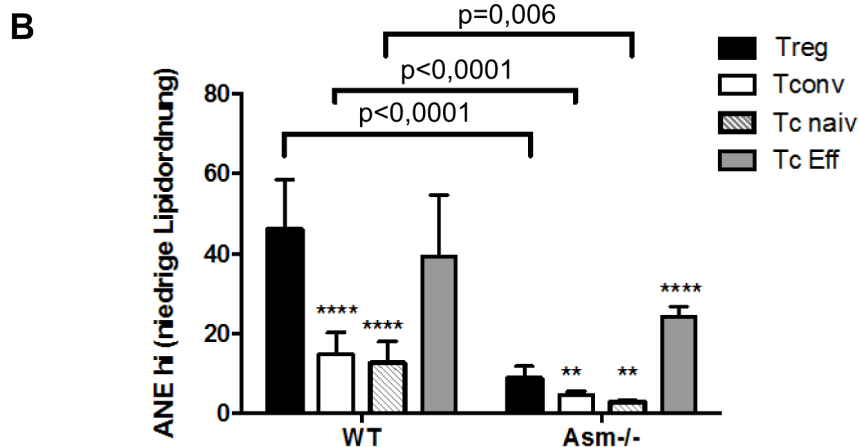
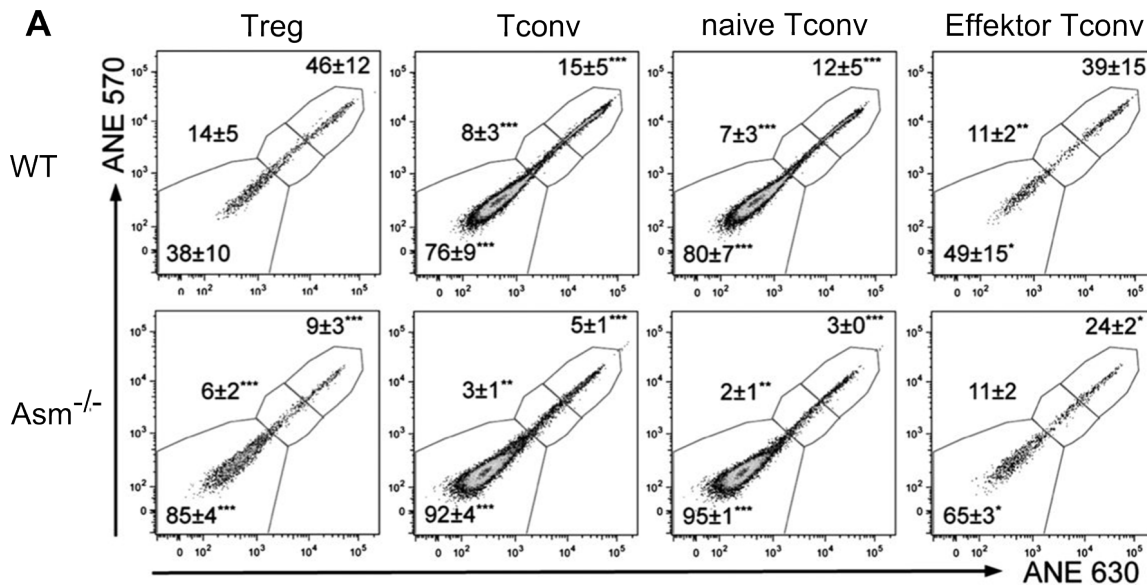


Abb. 9 Erniedrigte Lipidordnung in Treg Zellen und Effektor-Tconv Zellen.

Die Lipidordnung von Treg und Tconv Zellen aus WT und Asm^{-/-} Mäusen, sowie naiven und Effektor-Tconv Zellen wurde durch Einlagerung des ANE Farbstoffs in die Membran am FACS analysiert. (A) Gezeigt wird die ANE 570 versus ANE 630 Fluoreszenz. ANE doppelt-positive Zellen zeigen eine niedrige Lipidordnung an, doppelt-negative präsentieren eine hohe Lipidordnung. (B) Anteil der Zellen mit niedriger Lipidordnung innerhalb einzelner T-Zell Populationen aus WT und Asm^{-/-} Mäusen. Dargestellt werden Mittelwerte und die Standardabweichung von n=5-13 Tieren. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigem Student T-Test berechnet (*p< 0,05, **p< 0,01, ***p<0,001), die Sternchen beziehen sich auf den Unterschied im Vergleich zu Treg Zellen. Erstmalige Veröffentlichung der Daten in Hollmann et al. 2016¹³⁶.

Im Gegensatz zu den WT Mäusen hatten Treg und Tconv Zellen aus $Asm^{-/-}$ Mäusen vor allem Membranen mit einer hohen Lipidordnung. Nur 5 % der Tconv Zellen und 9% der Treg Zellen wiesen Membranen mit einer niedrigen Lipidordnung auf.

Im Vergleich von WT und $Asm^{-/-}$ Mäusen fiel auf, dass sich vor allem die Treg Zellen unterschieden. In WT Mäusen hatte ein größerer Anteil der Treg Zellen Membranen mit niedriger Lipidordnung, während Treg Zellen aus $Asm^{-/-}$ Mäusen vorwiegend Membranen mit hoher Lipidordnung aufwiesen. Während in WT Treg Zellen 46 % der Zellen Membranen mit einer niedrigen Lipidordnung aufwiesen, waren es bei $Asm^{-/-}$ Treg Zellen nur noch 9 %. Die Tconv aus WT und $Asm^{-/-}$ variierten sich nicht so stark, hier sind die Membranen jeweils eher geordnet und damit ANE negativ. Wie zuvor beim Ceramidgehalt, besaßen sowohl WT Effektor-Tconv Zellen als auch WT Treg Zellen einen höheren Anteil an Zellen mit einer niedrigen Membranlipidordnung, wohingegen der größte Anteil der naiven Tconv Zellen eine hohe Lipidordnung aufwiesen (Abb. 9 A und B).

Zusammenfassend konnte eine höhere Asm Aktivität bei Treg Zellen nachgewiesen werden, widerspiegelt durch ein höheres Level an Ceramid, sowie eine eher niedrigen Membranordnung.

4.3. Asm-defiziente Tiere wiesen eine erhöhte Treg-Frequenz und Funktion auf

4.3.1. Gesteigerte Suppressivität der Treg Zellen aus $Asm^{-/-}$ Mäusen

Wie wir mit unterschiedlichen Methoden zeigen konnten, hatten Treg Zellen eine gesteigerte Asm Aktivität und einen höheren Ceramidgehalt als Tconv Zellen. Dementsprechend wird sich vermutlich eine Asm-Defizienz besonders stark auf die Treg Zellen auswirken. Treg Zellen regulieren die Immunantwort, indem sie Tconv Zellen und Antigen-präsentierende Zellen mittels verschiedener Mechanismen inhibieren. Die Fähigkeit zur Suppression wurde daher im nächsten Schritt für WT und $Asm^{-/-}$ Treg gegenüberstellend untersucht. Es wurde ein *in vitro* Suppressionsassays durchgeführt, bei dem isolierte Tconv und Antigen-präsentierende Zellen mit dem Proliferationsmarker eFluor 670 markiert wurden und in Gegenwart von unterschiedlichen Mengen von Treg Zellen inkubiert wurden. Anschließend wurde die Proliferation der Indikator T-Zellen in Anwesenheit von anti-CD3 monoklonalem

Antikörper und CD28 Stimulation durch die Antigen-präsentierenden Zellen analysiert. Wie in Abb. 10 A zu erkennen ist, proliferierten Indikator-T-Zellen in Gegenwart von CD3 und CD28 Stimulation sehr gut und teilten sich bis zu fünfmal im Inkubationszeitraum von drei Tagen. In Gegenwart von regulatorischen T-Zellen, hier gezeigt Treg vs. Tconv Zellen im Verhältnis von 1:4, teilten sich die T-Zellen deutlich weniger (Abb. 10 A). Mit zunehmender Anzahl an Treg Zellen wurde die Indikatorzellproliferation stärker gehemmt. Im Vergleich supprimierten Treg Zellen aus $Asm^{-/-}$ Mäusen die Indikator-T-Zellproliferation stärker als Treg Zellen aus WT Tieren (Abb. 10 B). Dabei spielte es keine Rolle, ob die Indikator-T-Zellen wildtypisch oder $Asm^{-/-}$ waren.

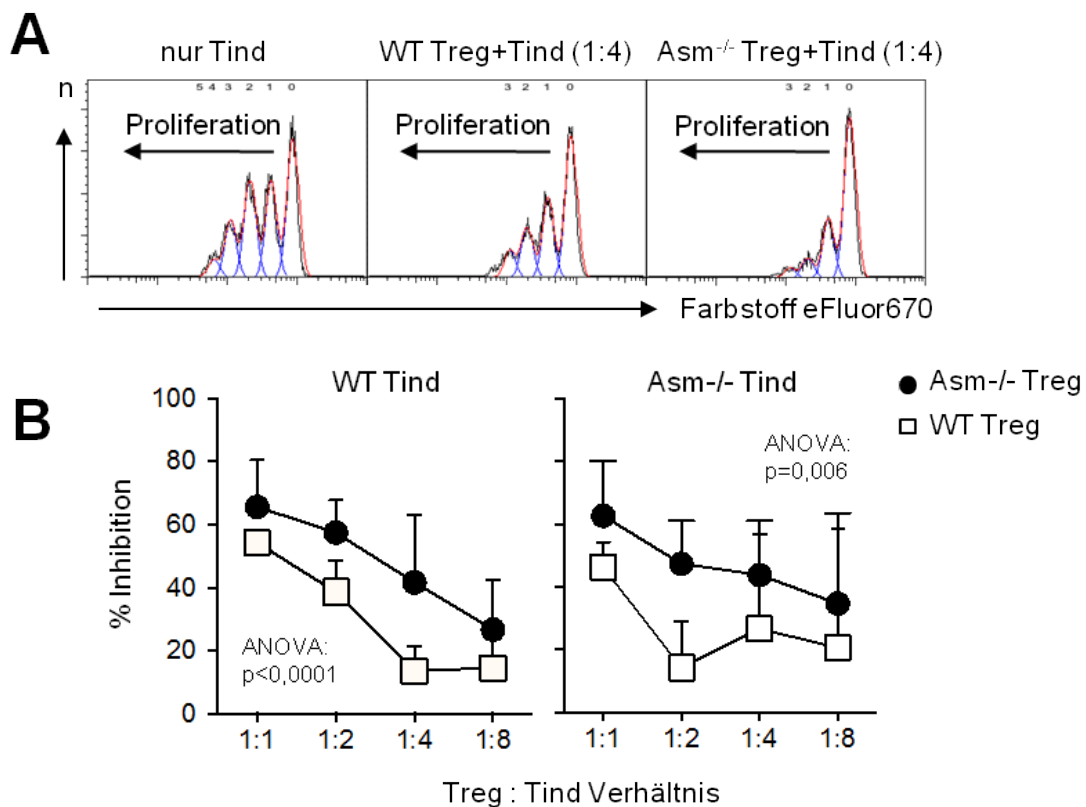


Abb. 10 Verstärkte Suppression von Indikator T-Zellen durch $Asm^{-/-}$ Treg Zellen im Vergleich zu WT Treg Zellen.

Mit eFluor 670 markierte Indikatorzellen wurden mit anti-CD3 Antikörper und APCs in An- oder Abwesenheit von Treg Zellen aus WT oder $Asm^{-/-}$ Mäusen stimuliert. **(A)** Gezeigt ist die Verdünnung des Farbstoffs eFluor 670 nach 3 Tagen Inkubation (Verhältnis WT Treg:Tind = 1:4). **(B)** Prozentuale Suppression der Proliferation der WT (links) oder $Asm^{-/-}$ (rechts) Indikatorzellen durch WT Treg (weiße Quadrate) oder $Asm^{-/-}$ Treg (schwarze Kreise). Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung aus $n = 8$ Tieren und statistischer Auswertung mittels zweiseitigem ANOVA Test. Erstmalige Veröffentlichung der Daten in Hollmann et al. 2016¹³⁶.

4.3.2. Erhöhter CTLA-4 Umsatz als mögliche Ursache für die verstärkte Treg-vermittelte Suppression

Treg-vermittelte Suppression basiert auf unterschiedlichen Mechanismen, beispielsweise durch inhibitorische Zytokine, Deprivation von IL-2 und ATP, sowie Zell-Kontakt-abhängige Mechanismen^{91,100,104}. Die Expression der alpha-Kette des IL-2 Rezeptors, CD25, sowie die Produktion von IL-10 war in WT und *Asm*^{-/-} Mäusen unverändert (nicht gezeigte Daten). Im Fokus der Analyse stand CTLA-4, welches stetig in Vesikeln zwischen intrazellulären Speichern und der Zelloberfläche hin und her transportiert wird. Die *Asm* ist wichtig für die lysosomale Integrität, daher könnte die Abwesenheit des Enzyms den CTLA-4 Transport in *Asm*^{-/-} Mäusen beeinträchtigen. Erste *ex vivo* Analysen des CTLA-4-Gehalts mittels FACS und Mikroskopie blieben erfolglos, da sich aufgrund der hohen Zirkulation nur geringe Mengen an CTLA-4 Molekülen zeitgleich an der Oberfläche befinden und anfärben lassen (Daten nicht gezeigt). Mittels eines *in vitro* "Capture Assay" wurde die Menge des an die Oberfläche transportierten CTLA-4s über die Zeit analysiert. Dafür wurden die Lymphozyten für einen bestimmten Zeitraum in Gegenwart von einem anti-CTLA-4 PE Antikörper inkubiert. Dieser färbte jedes CTLA-4 Molekül an, das im Inkubationszeitraum an der Zelloberfläche erscheint. Als Vergleichswert wurde die totale CTLA-4 Menge durch Färbung permeabilisierter Zellen bestimmt. Für die Analyse wurden jeweils die Treg Zellen gegatet. Hinsichtlich der Gesamtmenge an CTLA-4 konnte kein Unterschied zwischen WT und *Asm*^{-/-} Treg Zellen festgestellt werden (Abb. 11 A, rechtes Histogramm), daher ist vermutlich die Expression und Synthese nicht von der *Asm*-Defizienz betroffen. Der Capture Assay jedoch demonstrierte, dass in Bezug auf die CTLA-4 Gesamtmenge in *Asm*^{-/-} Treg Zellen mehr CTLA-4 an die Oberfläche über einen Zeitraum von 24 Stunden transportiert wurde als bei Vergleichszellen aus WT Mäusen (Abb. 11 B). Zusätzliche CD3 Stimulation führte zu einem erhöhten Zirkulieren von CTLA-4 sowohl in WT als auch in *Asm*^{-/-} Lymphozyten (Abb. 11 B). Die erhöhte CTLA-4 Umsatzrate in *Asm*^{-/-} Treg Zellen könnte die verstärkte Suppression dieser Zellen erklären.

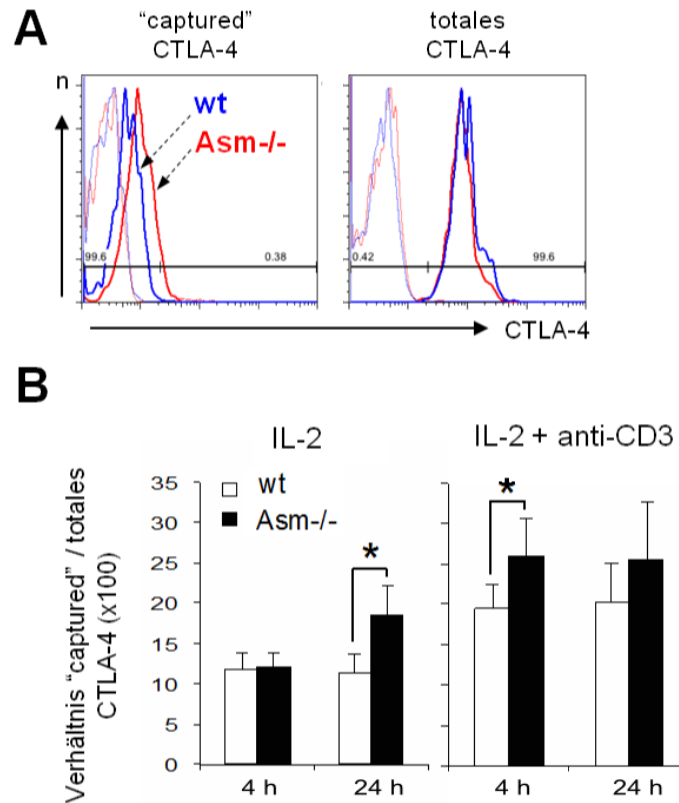


Abb. 11 Verstärkter Transport von CLTA-4 Molekülen an die Oberfläche in $Asm^{-/-}$ Treg Zellen im Vergleich zu WT Zellen.

Lymphozyten aus WT und $Asm^{-/-}$ Tieren wurden in Gegenwart von IL-2 und optional anti-CD3 Antikörpern kultiviert. Für die Analyse wurde auf $CD4^{+} CD25^{+} Foxp3^{+}$ Treg Zellen gegatet. Während unterschiedlicher Zeiträume (4 und 24 Stunden) wurde das an die Oberfläche transportierte CTLA-4 durch anti-CTLA-4 Antikörper markiert. **(A)** Repräsentative Histogramme des markierten CTLA-4 in gegateten Treg Zellen nach einer 24-stündigen Kultur von Lymphknotenzellen in Gegenwart von IL-2. Im linken Histogramm wird die Menge des spezifisch markierten CTLA-4s (durchgezogene Linie) während der Inkubation im Gegensatz zur PE Isotypkontrolle (gepunktete, schwache Linie) dargestellt. Im rechten Histogramm wird die vorhandene Gesamtmenge an CTLA-4 dargestellt, was durch intrazelluläre FACS-Färbung permeabilisierter T-Zellen analysiert wurde. **(B)** Quantitative Auswertung des Capture Assays. Für den Vergleich der Ergebnisse wurde das Verhältnis von "captured" CTLA-4, welches an die Oberfläche gelangt und markiert wurde, zur Gesamtmenge von CTLA-4 gebildet. Das linke Diagramm zeigt die relative Menge des "captured" CTLA-4 nach 4 und 24 Stunden bei Behandlung der Zellen mit IL-2, das rechte Diagramm nach IL-2 Behandlung und anti-CD3 Stimulation. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichung ($n=5$). Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigem Student T-Test berechnet (* $p < 0,05$). Erstmalige Veröffentlichung der Daten in Hollmann et al. 2016¹³⁶.

4.3.3. Erhöhte Frequenz von regulatorischen T-Zellen in $Asm^{-/-}$ Mäusen

Wie soeben beschrieben, beeinflusste die Abwesenheit der Asm Treg Zellen auf Einzelzellebene in Form von einer erhöhten Suppressivität und erhöhter Zirkulation von CTLA-4 Molekülen. FACS-Analysen zeigten, dass sich die Asm -Defizienz auch auf das T-Zell-Kompartiment im Ganzen auswirkte. $Asm^{-/-}$ Tiere hatten eine signifikant höhere Treg-Frequenz in der Milz, allerdings nicht im Lymphknoten (Abb.

12 A und B oben). Wie man anhand der absoluten T-Zellzahlen erkennen kann, handelte es sich hierbei nicht um eine Expansion der Treg Zellen (Abb. 12 B, Mitte), sondern um eine Abnahme der konventionellen T-Zellen (Abb. 12 B, unten). Sowohl im Thymus (Abb. 12 C), dem Ort der Entstehung von natürlichen Treg Zellen, als auch in Milzen junger Mäuse, bis 12 Wochen (Abb. 12 D), gab es keine signifikante Erhöhung der Treg-Frequenz innerhalb von CD4⁺ T-Zellen in *Asm*^{-/-} Mäusen. Entsprechend ist die Generierung von Treg Zellen durch die *Asm*-Defizienz nicht grundsätzlich betroffen. Mit zunehmendem Alter (ab 14 Wochen) wiesen *Asm*^{-/-} Mäuse eine signifikant höhere Treg-Frequenz auf als WT Mäuse (Abb. 12 D).

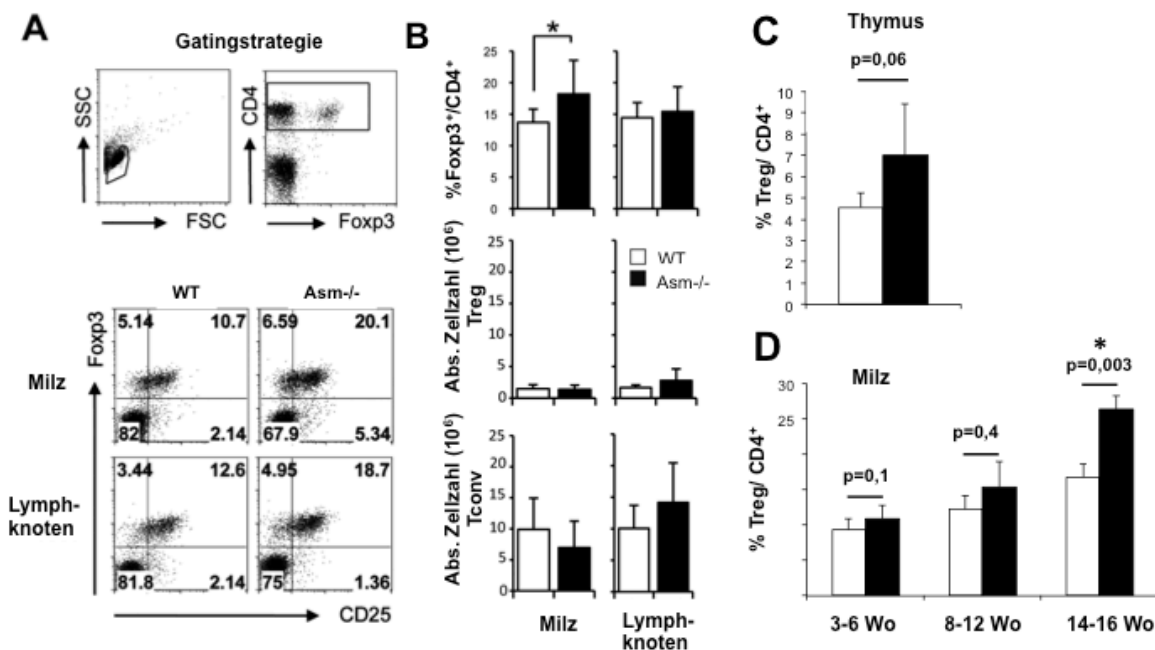


Abb. 12 Erhöhte Frequenz von Foxp3⁺ Treg Zellen in *Asm*^{-/-} Mäusen.

(A) Repräsentative FACS-Daten der Expression von CD25 und Foxp3 auf CD4⁺ T-Zellen aus Milz und Lymphknoten von WT und *Asm*^{-/-} Tieren. (B) Quantitative Auswertung der FACS-Daten aus Milz und Lymphknoten von WT Tieren (weiße Balken) und *Asm*^{-/-} Tieren (schwarze Balken). Analysiert wurde die Treg-Frequenz (B, oben), die absolute Treg Zellzahl (B, Mitte) sowie die absolute Tconv Zellzahl (B, unten) (n=13 pro Gruppe). (C) Analyse der Treg-Frequenz im Thymus von WT Tieren (weiße Balken) und *Asm*^{-/-} Tieren (schwarze Balken). (D) Altersabhängige Darstellung der Treg-Frequenz in der Milz. Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte und Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigem Student T-Test berechnet (*p< 0,05). Erstmalige Veröffentlichung der Daten aus A und B in Hollmann et al. 2016¹³⁶.

Neben der Anzahl und Frequenz der Treg Zellen wurde auch deren Aktivierung analysiert. CD44 ist ein Marker für die T-Zell Aktivierung und wird von T-Zellen exprimiert, die bereits Antigenkontakt hatten. Dementsprechend werden Effektor/Gedächtniszellen als CD44⁺ CD62L⁻ definiert gegenüber naiven, CD44⁻ CD62L⁺ T-Zellen. Signale über CD44 induzieren die Il-2 Produktion und die T-

Zellproliferation ¹⁴¹. Beim *ex vivo* Vergleich von Treg Zellen aus WT und *Asm*^{-/-} Mäusen zeigte sich auch, dass *Asm*^{-/-} Treg Zellen einen höheren Aktivierungszustand in Form einer höheren Expression des Aktivierungsmarkers CD44 aufwiesen (Abb. 13 A und B). Folglich hatten *Asm*^{-/-} Mäuse eine höhere Frequenz regulatorischer T-Zellen, die zudem aktiver und stärker suppressiv waren als wildtypische Treg Zellen.

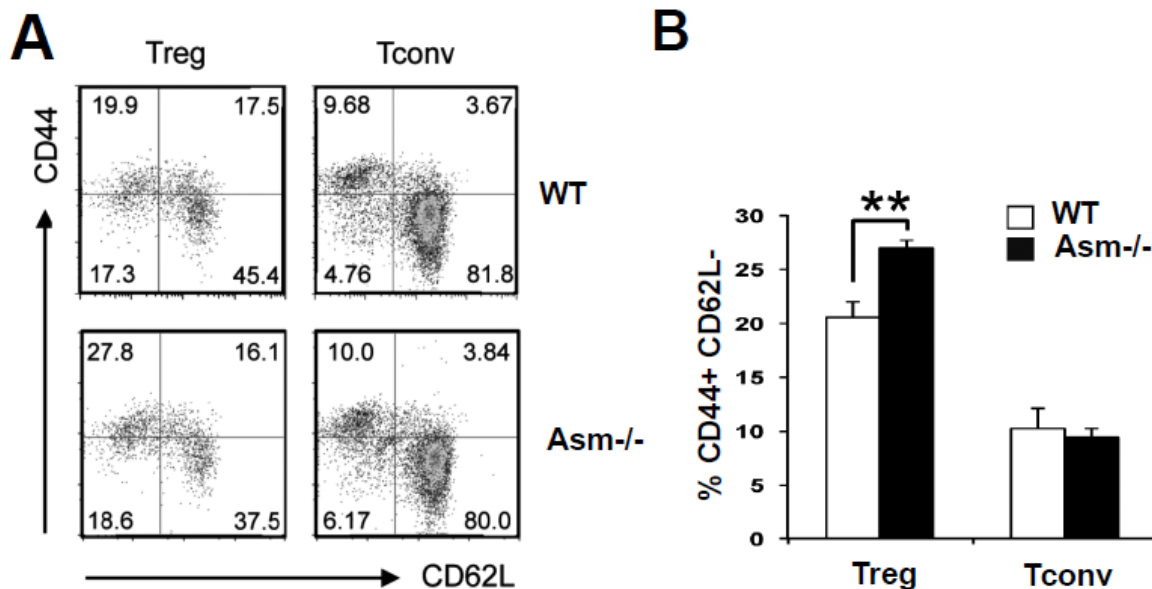


Abb. 13 Verstärkte Aktivierung der *Asm*^{-/-} Foxp3⁺ Treg Zellen.

(A) Repräsentative FACS-Daten der CD44 und CD62L Expression und (B) quantitative Auswertung des Anteils an Effektor-T-Zellen (CD44⁺ CD62L⁻) innerhalb der CD4⁺ T-Zellen aus der Milz von WT und *Asm*^{-/-} Mäusen (n=5). Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigem Student T-Test berechnet (*p < 0,05, **p < 0,01). Erstmalige Veröffentlichung der Daten in Hollmann et al. 2016 ¹³⁶.

4.4. Desipramin-induzierter Treg-Frequenzanstieg wurde durch den selektiven Zelltod von Tconv Zellen bedingt

4.4.1. Asm Inhibitoren verringerten zuverlässig Asm Aktivität *in vitro*

Eine Erhöhung der Treg-Frequenz, wie im Fall der *Asm*^{-/-} Mäuse vorliegend, wäre bei der Behandlung verschiedener Erkrankungen, insbesondere bei allergischen und Autoimmunerkrankungen, vorteilhaft ¹⁴²⁻¹⁴⁴. Demensprechend wäre es von therapeutischem Nutzen, wenn man durch den Einsatz von Asm Inhibitoren ebenfalls eine Erhöhung der Treg-Frequenzen erreichen könnte. Das die trizyklische Asm Inhibitoren Amitriptylin und Desipramin die Asm Aktivität hemmen wurde bereits in verschiedenen Krebszelllinien ¹⁴⁵, murinen und humanen Fibroblasten ¹⁴⁶ und verschiedenen Lymphozyten ¹⁴ gezeigt. Der Wirkmechanismus beruht auf Inhibitor-

vermittelte Verdrängung, der daraus resultierenden Ablösung der Asm von der Plasmamembran und deren Degradation¹⁴. Es wurde überprüft, ob eine Hemmung der Asm durch Inhibitoren auch auf CD4⁺ T-Zellen zutrifft. Die Wirksamkeit der Asm Inhibitoren wird hier beispielhaft für Desipramin gezeigt. Nach einer zweistündigen Inkubation von WT bzw. Asm^{-/-} Splenozyten mit jeweils verschiedenen Konzentrationen von Desipramin (0,6 -10 µM) wurde die verbleibende Asm Aktivität mittels Asm Assay gemessen. In WT Zellen nahm die Asm Aktivität mit zunehmender Inhibitorkonzentration ab (Abb. 14). Sehr hohe Konzentrationen des Inhibitors verminderten die Vitalität der Zellen (nicht gezeigte Daten). Asm^{-/-} Zellen hatten erwartungsgemäß keine Asm Aktivität, was auch durch Zugabe von Desipramin unverändert blieb.

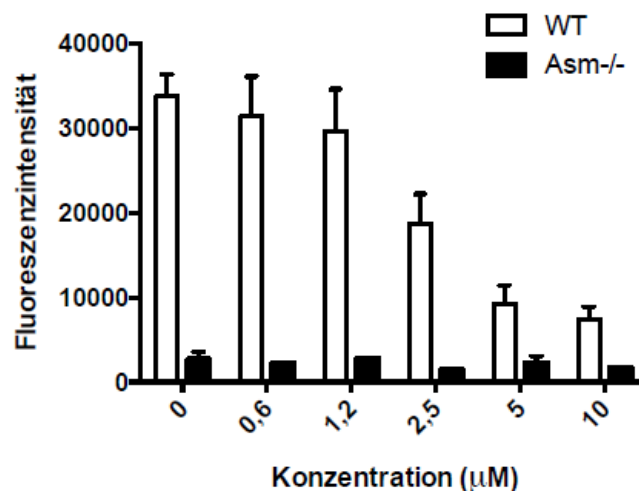


Abb. 14 Verminderte Asm Aktivität in WT Zellen, aber nicht in Asm^{-/-} Zellen, durch trizyklische Asm Inhibitoren.

CD4⁺ T-Zellen aus WT oder Asm^{-/-} Milzen wurden für 2 Stunden bei 37°C mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors Desipramin inkubiert. Die Asm Aktivität wurde anhand der Fluoreszenzintensität des entstanden HMU Produkts im Asm Assay gemessen. Gezeigt ist eines aus zwei unabhängige Experimente mit Messtriplikaten.

4.4.2. Behandlung von wildtypischen Mäusen mit Amitriptylin erhöhte die Treg-Frequenz *in vivo*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Frequenz von Treg Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen in Asm^{-/-} Mäusen erhöht war, lautete die Frage, ob man durch gezielte Inhibition der Asm eine Erhöhung der Treg-Frequenz in WT Tieren induzieren kann. Deshalb wurden WT Mäuse intraperitoneal mit 0,5 mg Amitriptylin, gelöst in 0,9%iger Kochsalzlösung, gespritzt oder nur mit Lösungsmittel als Kontrolle behandelt. Die

pplikation erfolgte an drei aufeinanderfolgenden Tagen morgens und abends und am dritten Tag nur morgens. An Tag 3 wurden die Milz und Lymphknoten entnommen und hinsichtlich ihrer T-Zell-Populationen untersucht. Zur Sicherheit wurde überprüft, ob die intraperitoneale Applikation von Amitriptylin erfolgreich war und ob der Inhibitor entsprechend ins Blut aufgenommen und umgesetzt wurde. Dafür wurde die Serumkonzentration von Amitriptylin und dem Metabolit Nortriptylin gemessen. In Kontroll-behandelten Tieren konnte, wie zu erwarten, kein Amitriptylin aufgezeigt werden. In Amitriptylin-behandelten Mäusen wurde sowohl Amitriptylin als auch Nortriptylin im Blutserum nachgewiesen (Abb. 15).

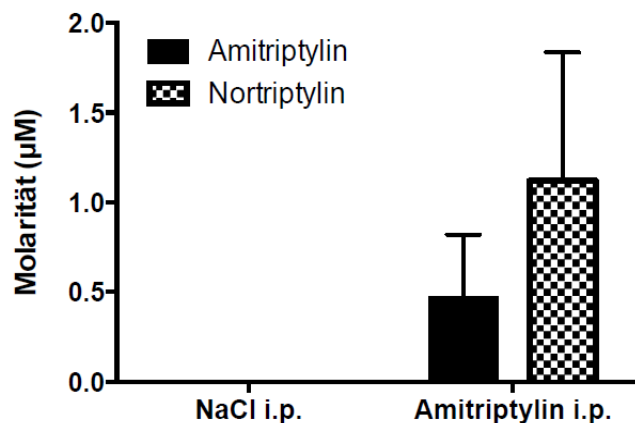


Abb. 15 Nachweis von Amitriptylin und dessen Metabolit Nortriptylin im Blutserum von Amitriptylin-behandelten Mäusen, aber nicht in Kontroll-behandelten Mäusen.

Blutserumproben von *in vivo* behandelten Mäusen (Amitriptylin oder Kontroll-NaCl Lösung) wurden biochemisch hinsichtlich der Konzentration von Amitriptylin und dessen Metabolit Nortriptylin untersucht (n=7 pro Gruppe).

Bei der Analyse der an Tag 3 entnommenen Milz und Lymphknoten wiesen die Amitriptylin-behandelten Mäuse im Vergleich zu Kontroll-behandelten Mäusen eine signifikante Erhöhung der CD25⁺ Foxp3⁺ Treg-Frequenz auf (Abb. 16 A und B). Der Anstieg der Frequenz war durch eine Abnahme der absoluten Zellzahl der Tconv Zellen infolge der Inhibitorwirkung zu erklären und kam nicht aufgrund einer Expansion der absoluten Treg Zellen zustande (Abb. 16 C). Die Ergebnisse korrelierten mit den Ergebnissen bezüglich der Treg-Frequenz und Zellzahl im Vergleich von WT und Asm^{-/-} Mäusen (Abb. 12 B). Die Amitriptylinbehandlung der WT Mäuse beeinflusste auch die totale Expression von CTLA-4 und war nach Behandlung signifikant erhöht (Abb. 16 A und D).

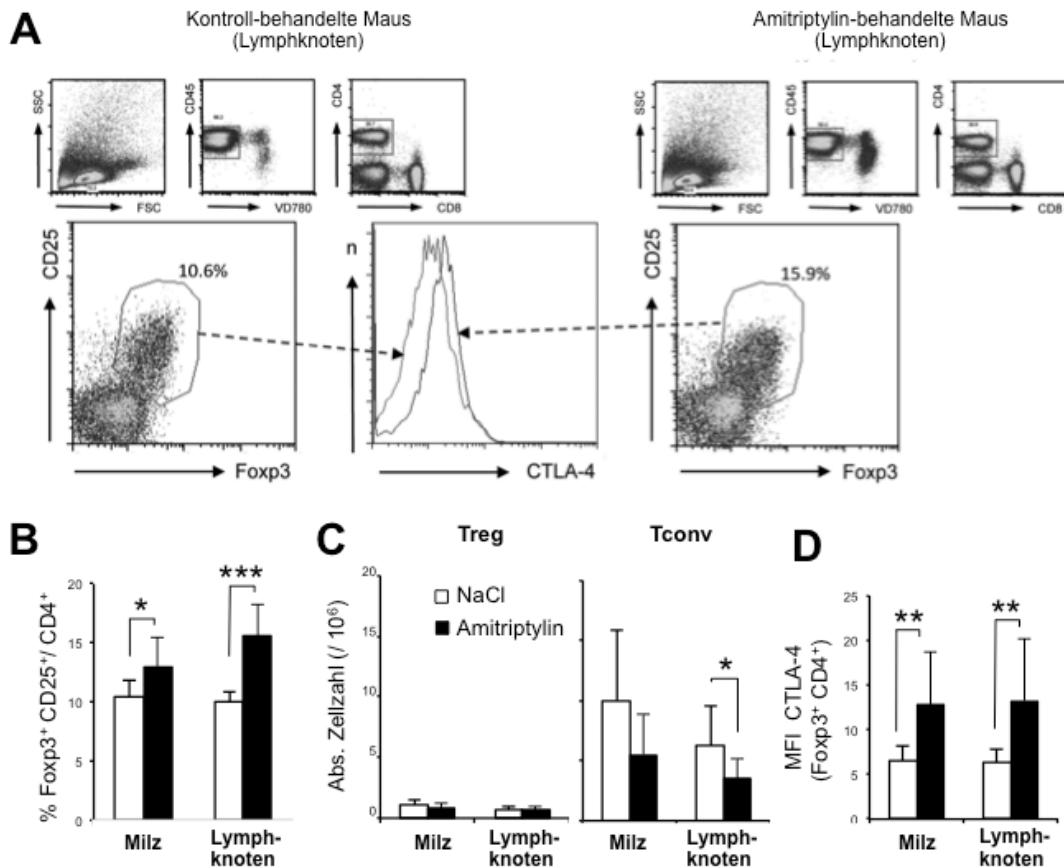


Abb. 16 Erhöhung der Treg-Frequenzen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen nach *in vivo* Behandlung von C57BL/6 WT Mäusen mit dem Asm Inhibitor Amitriptylin.

C57BL/6 WT Mäuse wurden insgesamt 5x an drei aufeinanderfolgenden Tagen i.p. mit 0,5 mg Amitriptylin behandelt und die gepoolten Lymphknoten sowie Milzen analysiert. **(A)** Repräsentative FACS-Daten und Gatingstrategie; gezeigt werden CD4⁺ T-Zellen vorgegated auf CD45⁺, lebende Leukozyten. Analysiert wurde die Expression von CD25 und Fopx3 als Marker für Treg und Tconv Zellen, sowie CTLA-4 Expression innerhalb der Treg Zellen. **(B)** Frequenz der Treg Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen aus Milz und Lymphknoten in Mäusen, die mit Amitriptylin (schwarze Balken) oder mit 0,9 %iger Kochsalzlösung (weiße Balken) behandelt wurden. **(C)** Absolute T-Zellzahlen von Treg und Tconv Zellen nach Behandlung. **(D)** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der totalen CTLA-4 Expression der Treg Zellen aus Amitriptylin behandelten Mäusen (schwarze Balken) und Kontrolltieren (weiße Balken). Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung aus n=9-10 Tiere. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem Student T-Test (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001). Erstmalige Veröffentlichung der Daten in Hollmann et al. 2016¹³⁶.

4.4.3. Nachweis der Wirkspezifität von Asm Inhibitoren ausschließlich auf WT T-Zellen anhand eines Zelltransferexperiments

Um zu überprüfen, ob der Anstieg der Treg-Frequenz auf direkte Inhibition der Asm in wildtypischen Treg Zellen durch die Amitriptylinbehandlung zurückzuführen ist und nicht auf sekundäre Effekte des Inhibitors auf andere Zellpopulationen zurückgeht, wurden Transferexperimente durchgeführt. Hierfür wurden CD4⁺ Zellen aus Thy1.1⁺ Thy1.2⁺ kongenen Mäusen in Asm^{-/-} Tiere (Thy1.1⁻ Thy1.2⁺) transferiert. Die drei-

tägige Behandlung mit Amitriptylin sollte ausschließlich die transferierten WT Zellen beeinflussen, nicht aber die endogenen $Asm^{-/-}$ Zellen. Der Anteil der transferierten $Thy1.1^+ Thy1.2^+$ WT Zellen an den Gesamtzellen betrug ca. 5 %. Innerhalb der transferierten $CD4^+$ WT T-Zellen stieg durch die Amitriptylinbehandlung die Treg-Frequenzen nicht an, wie in Abb. 16 B demonstriert, sondern blieb unverändert (Abb. 17 A). Allerdings führte die Behandlung mit Amitriptylin zu einer Abnahme der absoluten $CD4^+$ WT Tconv Zellzahl während die Zellzahl der $Asm^{-/-}$ Tconv Zellen nahezu konstant blieb (Abb. 17 B). Wie anhand der absoluten WT Treg Zellzahlen zu sehen ist (Abb. 17 C), nahm ebenfalls die Anzahl der transferierten WT Treg Zellen unter Amitriptylinbehandlung leicht ab. Dies erklärt warum, anders als in Abb. 16 B und C, die Abnahme der Tconv Zahlen nicht zu einem Anstieg der Treg-Frequenzen führte.

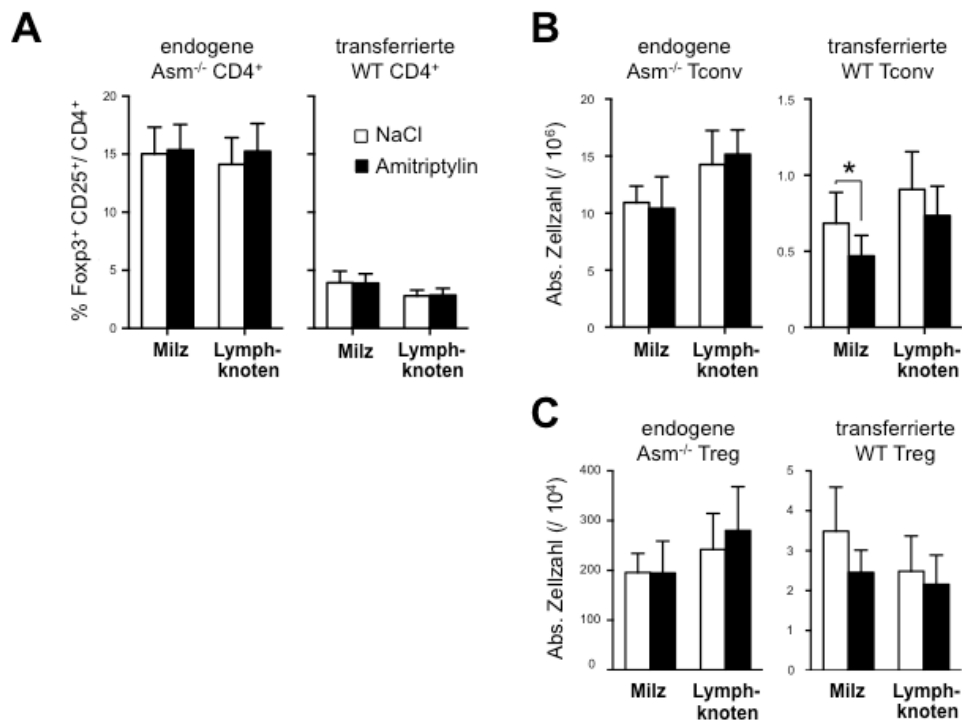


Abb. 17 Selektive Beeinflussung der WT T-Zellen durch Amitriptylinbehandlung, ohne Beeinflussung der endogenen $Asm^{-/-}$ T-Zellen.

Am Tag vor der Behandlung wurden $0,8-1 \cdot 10^7$ $Thy1.1^+ Thy1.2^+$ WT Zellen in $Asm^{-/-}$ Tiere ($Thy1.2^+ Thy1.1^-$) transferiert und in den folgenden drei Tagen wurden die Tiere fünfmal mit Amitriptylin oder 0,9 %iger Kochsalzlösung (Kontrolle) behandelt. **(A)** Treg-Frequenzen nach Behandlung innerhalb der endogenen $CD4^+$ $Asm^{-/-}$ T-Zellen (links) sowie innerhalb der transferierten $CD4^+$ WT T-Zellen (rechts). **(B)** Absolute Tconv Zellzahlen und **(C)** absolute Treg Zellzahlen innerhalb der endogenen $Asm^{-/-}$ T-Zellen und transferierten WT T-Zellen nach der Behandlung mit Amitriptylin (schwarze Balken) oder 0,9 %iger NaCl-Lösung (weiße Balken). Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung aus $n=5$ Tieren pro Gruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem Student T-Test (* $p < 0,05$). Erstmalige Veröffentlichung der Daten 14 A und B in Hollmann et al. 2016¹³⁶.

4.4.4. IL-2 schützte Treg Zellen vor der Asm induzierten Apoptose

Um den Mechanismus der selektiven Abnahme von Tconv Zellen, aber nicht von Treg Zellen, nach der *in vivo* Behandlung mit Amitriptylin besser zu verstehen, wurde ein *in vitro* System etabliert. Die Inkubation von WT Splenozyten mit ansteigenden Konzentrationen des Asm Inhibitors Desipramin in Gegenwart von IL-2 führte innerhalb der CD4⁺ Zellen zu einer Erhöhung der Treg-Frequenzen (Abb. 18 A) und entsprach damit den Daten, die *in vivo* gewonnen wurden (Abb. 16). Nach Analyse der absoluten Tconv Zahlen zeigte sich erneut, dass der Anstieg innerhalb der Treg-Frequenzen durch die Abnahme der absoluten Tconv Zahlen unter Asm Blockade zustande kam, während die absolute Treg Zellzahl gleich blieb (Abb. 18 A). Im *in vitro* System wurde nun die Rolle von IL-2 bei der Asm Blockade untersucht. IL-2 stimuliert das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben aktivierter T-Zellen. Für Treg Zellen ist IL-2 essentiell, da sie selbst keines produzieren können, dieses aber zum Erhalt der Homöostase sowie für deren Aktivierung und Proliferation benötigen^{63,67,147}. Die Behandlung mit Desipramin führte in Abwesenheit von IL-2 zu keinem Anstieg der Treg-Frequenzen, da sowohl die absoluten Tconv Zellzahlen als auch die absoluten Treg Zellzahlen abnahmen (Abb. 18 B). Das Vorhandensein von IL-2 schützte somit die Treg Zellen vor den Einflüssen von Desipramin im Gegensatz zu den Tconv Zellen, die im unstimulierten Zustand, wie es hier der Fall ist, keinen hochaffinen IL-2 Rezeptor (CD25, α -Kette) besitzen. Die gleichen Ergebnisse wurden erzielt, wenn nicht Gesamt-Milzzellen, sondern aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen aus der Milz verwendet wurden (Abb. 18 C und D). Dementsprechend wirkte Desipramin direkt auf die T-Zellen und die Effekte kamen nicht durch sekundäre Wechselwirkungen zustande, beispielsweise indem Desipramin auf andere Zelltypen wirkt, welche die T-Zellen beeinflussen.

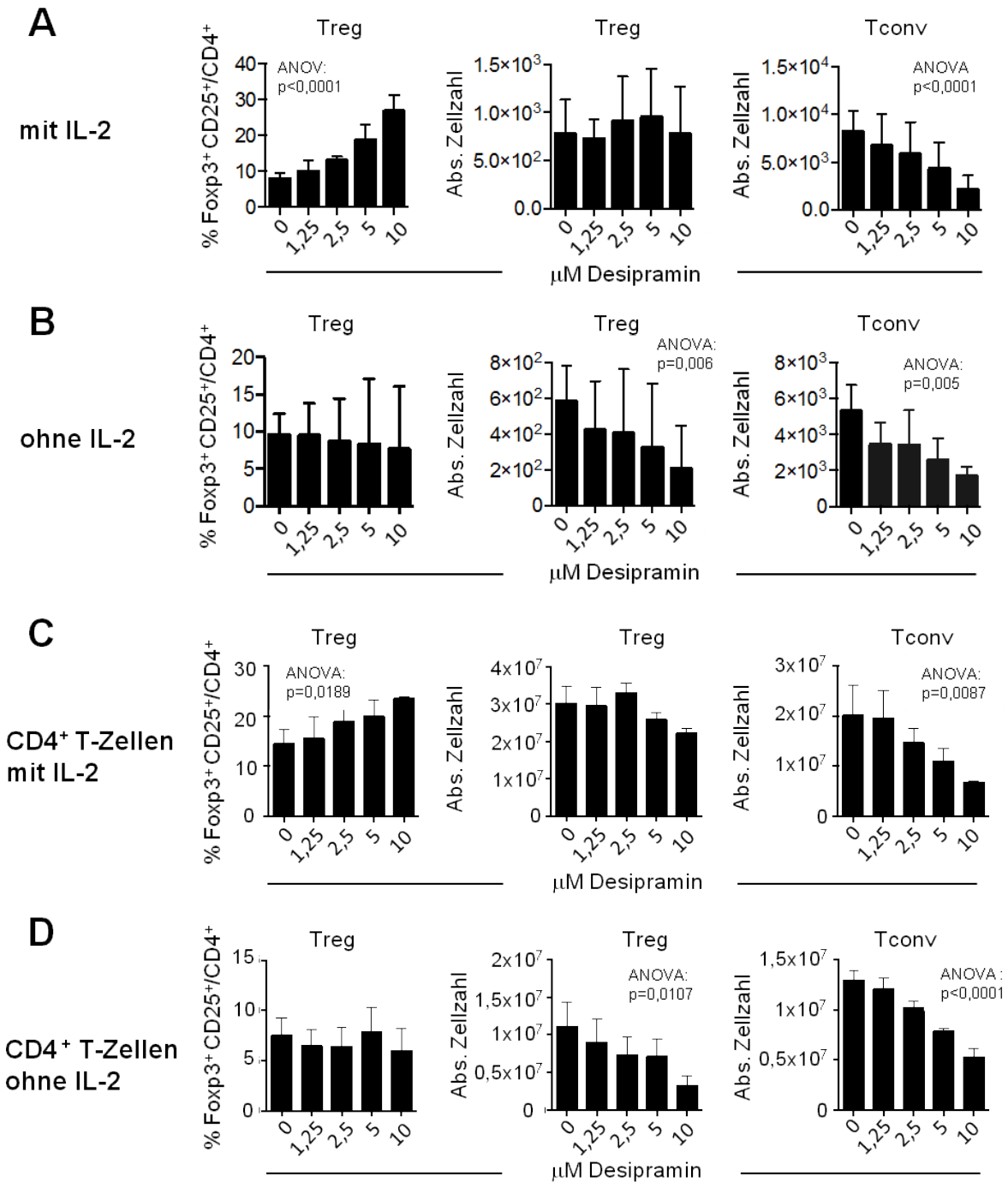


Abb. 18 Anstieg der Treg-Frequenz nach pharmakologischer *in vitro* Behandlung mit dem Asm Inhibitor Desipramin nur in Gegenwart von IL-2.

(A und B) Wildtypische Gesamt-Milzzellen beziehungsweise (C und D) wildtypische CD4⁺ Milzzellen (2×10^5 Zellen/Well, 96 Well Rundbodenplatte) wurden in Anwesenheit (A und C) und Abwesenheit (B und D) von 0,1 μ M IL-2 für 3 Tage kultiviert und der Einfluss von verschiedenen Mengen Desipramin auf die Zellen untersucht. Analysiert wurde die Treg-Frequenz (links), sowie die absolute Zellzahl von Treg Zellen (Mitte) und von Tconv Zellen (rechts). Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung aus $n=4$ Tieren pro Gruppe und zweiseitigem ANOVA Test für die statistische Auswertung. Erstmalige Veröffentlichung der Daten (A und B) in Hollmann et al. 2016¹³⁶.

Zur Kontrolle, ob die Inhibitoreffekte direkt oder indirekt waren, wurden WT Treg Zellen mit Tconv Zellen aus WT und $Asm^{-/-}$ Mäusen in unterschiedlichen Kombinationen gemischt und mit Inhibitor behandelt. Die Reduktion der Tconv Zellzahl ging auf einen direkten Effekt des Inhibitors auf die Tconv Zellen zurück und resultierte nicht aus einem indirekten Effekt vermittelt durch Asm -inhibierte Treg Zellen. Da es in $Asm^{-/-}$ Tconv Zellen nicht zu einer Abnahme kam, entstanden die Desipramineffekte spezifisch durch Blockade der Asm und nicht durch Off-Target Effekte.

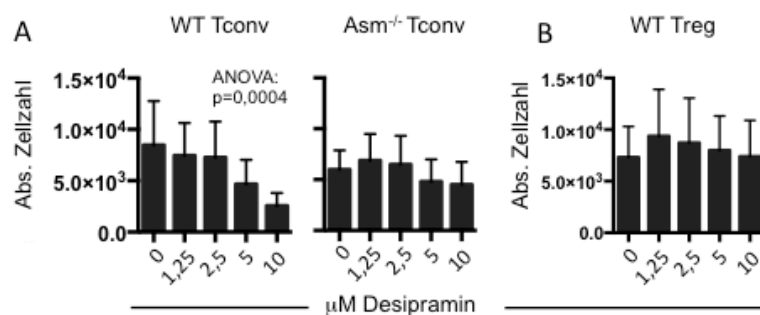


Abb. 19 Spezifische Wirkung des Asm Inhibitor Desipramin nach *in vitro* Gabe.

Treg-depletierte Lymphknotenzellen aus wildtypischen beziehungsweise $Asm^{-/-}$ Mäusen wurden in Anwesenheit von Treg Zellen aus WT Mäusen sowie von 0,1 µM $Il-2$ und verschiedenen Konzentrationen Desipramin für 3 Tage kultiviert. **(A)** Absolute Zellzahl der WT bzw. $Asm^{-/-}$ konventionellen T-Zellen unter Einfluss von Desipramin. **(B)** Absolute Zellzahl der WT Treg Zellen unter Einfluss von Desipramin. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung aus $n=5$ Tieren pro Gruppe und ANOVA Test für die statistische Auswertung. Erstmalige Veröffentlichung der Daten in Hollmann et al. 2016¹³⁶.

4.4.5. Desipramin induzierte Apoptose in T-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Anstieg der Treg-Frequenzen nicht auf einer Expansion der Treg Zellen beruht, sondern auf einer selektiven Abnahme der Tconv Zellzahlen, sollte nun die Art des Zelltods durch Desipramin geklärt werden. Dafür wurden die Zellen nach Behandlung mit Desipramin an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit fluoreszierendem Annexin V und einem Lebend-Tot-Farbstoff gefärbt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches sich in lebenden Zellen auf der Innenseite der Membran befindet. Lebende Zellen werden daher nicht mit Fluorochrom-gekoppeltem Annexin V angefärbt. Bei eintretender Apoptose jedoch klappt Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran und kann angefärbt werden¹⁴⁸. Wie in Abb. 20 zu erkennen ist, wird durch Desipramin Apoptose induziert, was anhand des zunehmenden Anteils der Annexin V⁺ Zellen zu sehen ist.

Je höher die Desipraminkonzentration ist, desto höher ist der Anteil der apoptotischen Zellen (Abb. 20). Die meisten Zellen wurden bereits an Tag 1 der Kultur apoptotisch, bis zu 40 % der Zellen in Gegenwart von 10 μM Desipramin. An Tag 2 und 3 war der Anteil an apoptotischen Zellen geringer (Abb. 20).

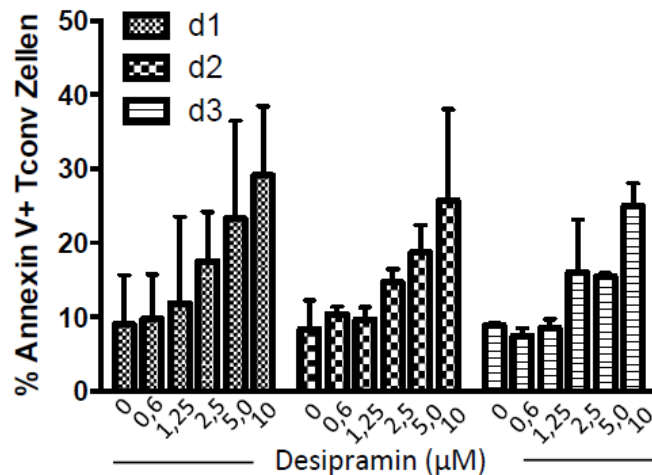


Abb. 20 Erhöhte Apoptose in Zellen nach Gabe hoher Desipraminkonzentrationen

Dargestellt wird der Anteil der Annexin V⁺ Tconv Zellen innerhalb der CD4⁺ Splenozyten nach 1-3 Tagen Inkubation in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen Desipramin und 1 μM IL-2. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung aus n=2 Tieren.

4.5. Defizienz oder pharmakologische Hemmung der Asm führte *in vivo* zu einer verstärkten Maserninfektion (MV)

4.5.1. Erhöhte Anzahl MV-infizierter Neuronen in *Asm*^{-/-} Mäusen

Wie in den letzten Kapiteln gezeigt wurde, hatte die *Asm*-Defizienz vielfältige Effekte auf T-Zellen. Sie verstärkte die Suppressivität von Treg Zellen, veränderte deren Aktivierung und führte zum selektiven Zelltod konventioneller T-Zellen. Als nächstes wurde die Auswirkung der genetischen Deletion der *Asm* bezüglich der Fähigkeit von Mäusen, auf Virusinfektionen zu reagieren, untersucht. Hierbei handelt es sich um ein Masernvireninfektionsmodell, bei dem zwei Wochen alte Mäuse intrazerebral mit einem rekombinanten Masernvirus (rMV-EdtagCAMHeGFP) infiziert wurden (Abb. 21 A). Dieses Virus trägt eine GFP-Gensequenz unter dem Promotor früher Virusproteine, sodass GFP immer produziert wird, wenn die RNA-abhängige Viruspolymerase aktiv ist. Entsprechend können infizierte Zellen detektiert werden. Des Weiteren beinhaltet das Virus ein Maus-adaptiertes Hämagglutinin-Protein (CAM-H), welches die Infektion muriner Neuronen ermöglicht. Im Versuch wurden WT, *Asm*^{+/-} und *Asm*^{-/-} Mäuse infiziert und der Krankheitsverlauf verglichen. Zur

Analyse der Virusinfektion wurden mittels Vibratom koronale Schnitte der PFA-fixierten Gehirne angefertigt und über die GFP-Expression infizierte Neuronen quantitativ ausgezählt (Abb. 21 B und C).

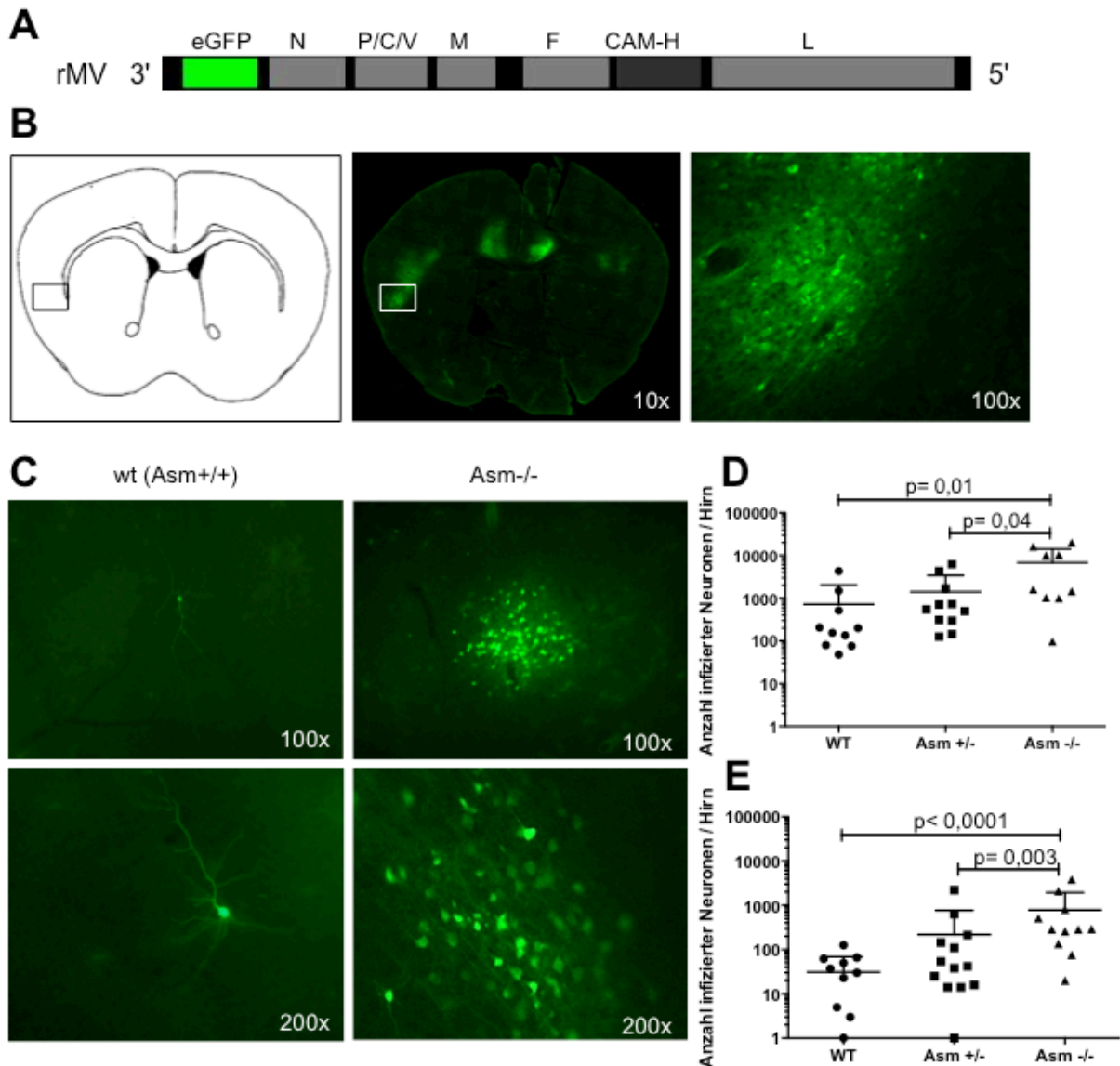


Abb. 21 Schlechte MV Infektionskontrolle in *Asm*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen.

(A) Schematische Darstellung des für die Infektion verwendeten rekombinanten Masernvirus Stamm (rMV-EtdagCAMHeGFP), welcher ein GFP Konstrukt zur Detektion infizierter Neuronen sowie ein Nager-adaptiertes Hämagglutinin -Protein (CAM-H) enthält. (B) Koronale Gehirnschnitte für die histologische Analyse der infizierten Neuronen nach Infektion am Fluoreszenzmikroskop. Schematische und mikroskopische Übersichtsbildung (10x Vergrößerung) des Gehirns sowie von eGFP autofluoreszenten Bereichen im Gehirn (100x Vergrößerung). (C) Mikroskopische Aufnahmen von infizierten Gehirnschnitten, aufgenommen bei zwei Vergrößerungen (100x und 200x), von wildtypischen Kontrolltieren (linke Abbildungen) und *Asm*^{-/-} Mäusen (rechte Abbildungen) während der persistenten Infektion an Tag 28. (D+E) Graphische Darstellung der Anzahl infizierter Neuronen an Tag 7 (D) und Tag 28 (E). Gezeigt werden die Mittelwerte von n=7-10 Tieren sowie zweiseitigem, ungepaartem Mann-Whitney Test für die Signifikanzberechnung. Erstmalige Veröffentlichung der Daten in Hollmann et al. 2016¹³⁶, die Abbildungen D und E wurden um weitere Daten ergänzt.

Untersucht wurde sowohl die akute Phase der Virusinfektion an Tag 7, gekennzeichnet durch eine hohe Viruslast, als auch die persistente Phase an Tag 28 nach Infektion. Zu diesem Zeitpunkt sind nur noch einzelne Neuronen infiziert oder kleine Foci infizierter Neuronen auffindbar. Dabei zeigte sich, dass $Asm^{-/-}$ infizierte Tiere in der akuten Phase (Tag 7, Abb. 21 D) eine 10-fach höhere Anzahl infizierter Neuronen aufwiesen als WT Tiere und eine 30-40-fach höhere Anzahl in der persistenten Phase (Tag 28, Abb. 21 E). Die Infektionsrate von $Asm^{+/-}$ Tieren war ähnlich zu der von WT Tieren. Die schlechte Infektionskontrolle bei den $Asm^{-/-}$ Mäusen deutete auf eine möglicherweise gestörte antivirale Immunantwort und mangelhafte Virusbeseitigung durch die Asm -Defizienz hin.

4.5.2. Während der akuten Phase nach MV Infektion wiesen $Asm^{-/-}$ Mäuse eine verringerte Anzahl an Masernvirus-spezifischen $CD8^{+}$ T-Zellen auf

Eine schlechte Kontrolle der Masernvireninfektion in $Asm^{-/-}$ Mäusen legte nahe, dass die Expression der sauren Sphingomyelinase für eine effiziente, masernspezifische Immunantwort notwendig sein könnte. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen und deren Aktivierung mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierfür wurden T-Zellen über Percollgradienten aus Kollagenase-verdauten Gehirnen isoliert. Verglichen wurden T-Zellen aus dem Gehirn mit T-Zellen aus den drainierenden, zervikalen Lymphknoten und den distalen, mesenterischen Lymphknoten und der Milz. Da generell nur relativ wenige T-Zellen im Gehirn vorhanden sind, wurde eine 10-Farben-FACS-Analyse (Marker $CD45$, $CD4$, $CD8$, $CD25$, $Foxp3$, $CTLA-4$, $Ki67$, $CD44$, T-bet, Viabilität) etabliert, um möglichst viele Immunzellpopulationen und Aktivierungsmarker gleichzeitig analysieren zu können. Eine zweite Färbung mittels MV-Peptid-beladenen Pentamerkonstrukten diente der Analyse der Masernvirus-spezifischen $CD8^{+}$ T-Zellen (siehe unten). Die isolierten T-Zellen aus dem Gehirn wurden zu gleichen Teilen auf die beiden Färbungen aufgeteilt. Für die Analyse der FACS-Daten wurden die Zellen wie folgt gegatet (Abb. 22): im Forward Scatter (FSC) und Sideward Scatter (SSC) wurden die Lymphozyten anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) definiert. Anschließend wurden Dubletten, also zusammenklebende Zellen, ausgeschlossen. Dubletten weisen z.B. bei gleicher "Höhe" (FSC-H) die doppelte "Weite" (FSC-W) auf. Für ein präzises Lymphozyten-

gating wurde mit dem Lymphozytenmarker CD45 auf die CD45⁺ Population gategat, sowie auf die lebenden Zellen. Tote Zellen sind positiv für den Lebend-Tot-Farbstoff (VD), da dieser in Zellen mit einer nicht-intakten Membran hinein diffundieren kann. Wie sich herausstellte, hatten einige Zellen aus dem Gehirn eine hohe Autofluoreszenz, was bedeutet, dass diese unspezifisch in jedem Kanal angeregt werden. Diese autofluoreszenten Zellen wurden mit Hilfe eines Leerkanals ausgeschlossen. Für die Analyse wurde mittels verschiedener Marker die CD8⁺ T-Zellen und die CD4⁺ T-Zellen unterschieden und letztere noch weiter in CD25⁻ Foxp3⁻ Tconv Zellen und CD25⁺ Foxp3⁺ Treg Zellen differenziert. Für die genannten Populationen wurden die Frequenzen der Zellen, sowie deren absolute Zellzahl bestimmt und außerdem die Proliferation (Ki-67) untersucht (Abb. 22).

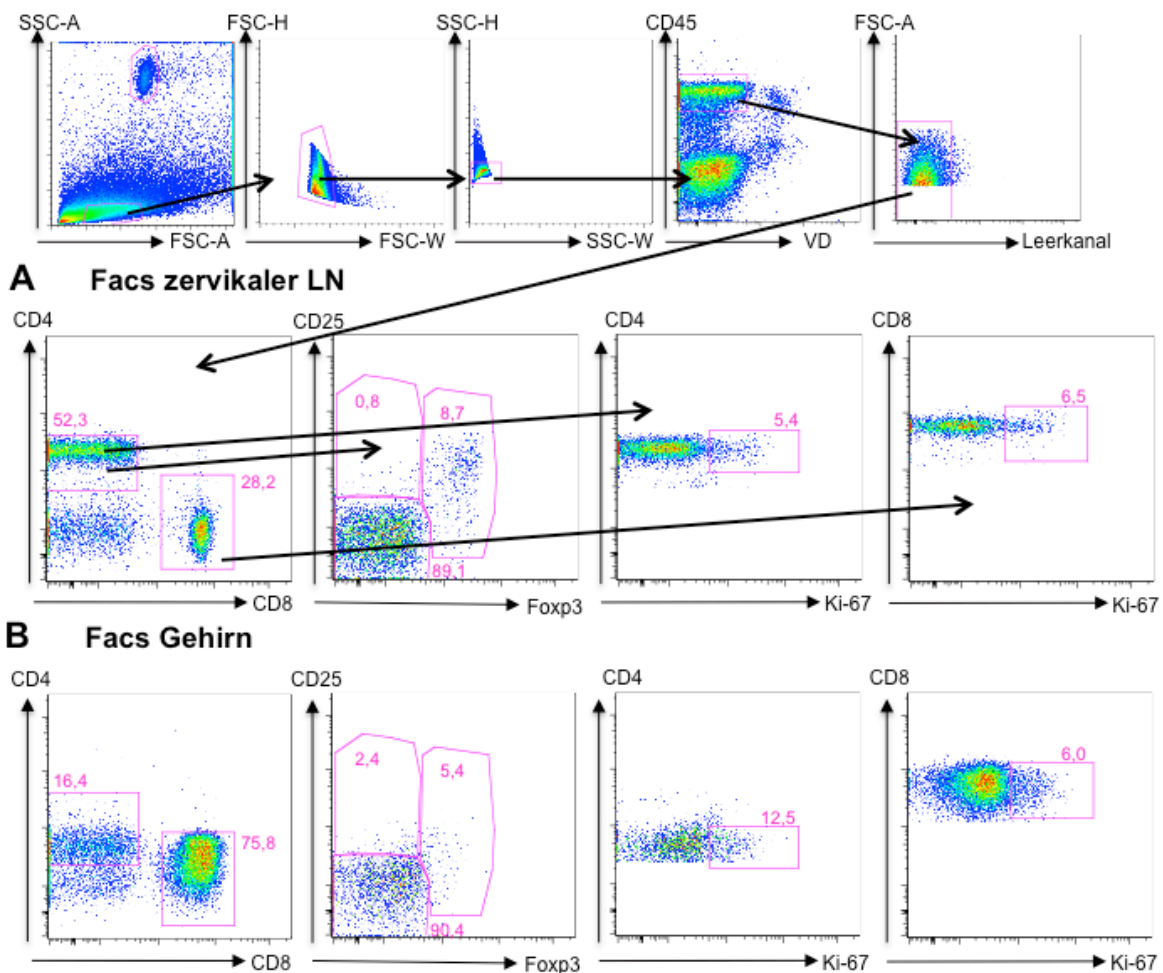


Abb. 22 Repräsentative Dot Plots und Gatingstrategie zur Analyse von Immunzellen nach Maserninfektion (28 dpi).

(A) Repräsentative FACS Dot Plots für Zellen aus dem zervikalem Lymphknoten und (B) aus dem Gehirn. Gating auf lebende, CD45⁺ Lymphozyten unter Ausschluss von Dubletten. Identifikation von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen, CD25⁻ Foxp3⁻ Tconv Zellen, CD25⁺ Foxp3⁺ Treg Zellen und Analyse des Proliferationsmarkers Ki-67, gezeigt wird die Frequenz des Gates innerhalb der Population in %.

Infolge der Maserninfektion kam es sowohl an Tag 7 als auch an Tag 28 nach Infektion zu einer erhöhten Infiltration von T-Zellen in das Gehirn, wobei es Unterschiede je nach Zelltyp, Genotyp und Zeitpunkt gab. In den verschiedenen peripheren Organen Milz, zervikaler und mesenterischer Lymphknoten, kam es zu keinen, signifikanten Veränderungen (nicht gezeigte Daten).

Die dominierende Lymphozytenpopulation während Viruserkrankungen sind $CD8^+$ T-Zellen. Nach Antigenkontakt differenzieren naive $CD8^+$ T-Zellen zu Zytotoxischen T-Zellen (ZTL), welche in der Lage sind infizierte Zellen durch Perforin und Granzymausschüttung zu lysieren. Die Analyse von infizierten und uninfizierten Gehirnen während der akuten Phase nach Infektion (d7 dpi) zeigte, dass es zu einer vermehrten Einwanderung von $CD8^+$ T-Zellen ins Gehirn von infizierten Mäusen kam (Abb. 23A). Dabei gab es keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Obwohl es zu einem Anstieg in der $CD8^+$ T-Zellfrequenz kam, gab es keinen signifikanten Anstieg der absoluten Zellzahl von $CD8^+$ T-Zellen in WT und $Asm^{+/-}$ Mäusen (Abb. 23A).

In der persistenten Phase der Infektion (d28 dpi) war die Frequenz von $CD8^+$ T-Zellen immer noch in infizierten Mäusen im Vergleich zu uninfizierten Mäusen stark erhöht (Abb. 23 C). In der späten Phase der Infektion zeigten sich auch deutliche Unterschiede zwischen WT, $Asm^{+/-}$ und $Asm^{-/-}$ Mäusen. Infizierte $Asm^{-/-}$ Mäuse hatten eine signifikant höhere $CD8^+$ T-Zellfrequenz innerhalb der $CD45^+$ T-Zellen als infizierte WT Mäuse (Abb. 23 C). Dies war auch der Fall in $Asm^{+/-}$ Mäusen, wenn auch der Unterschied hier nicht mehr signifikant war. In infizierten $Asm^{+/-}$ und $Asm^{-/-}$ Mäusen war auch die absolute Anzahl an $CD8^+$ T-Zellen gegenüber WT Mäusen erhöht (Abb. 23 D). Im Gegensatz dazu war die Anzahl der $CD8^+$ T-Zellen in infizierten WT Mäusen fast vergleichbar mit uninfizierten WT Mäusen.

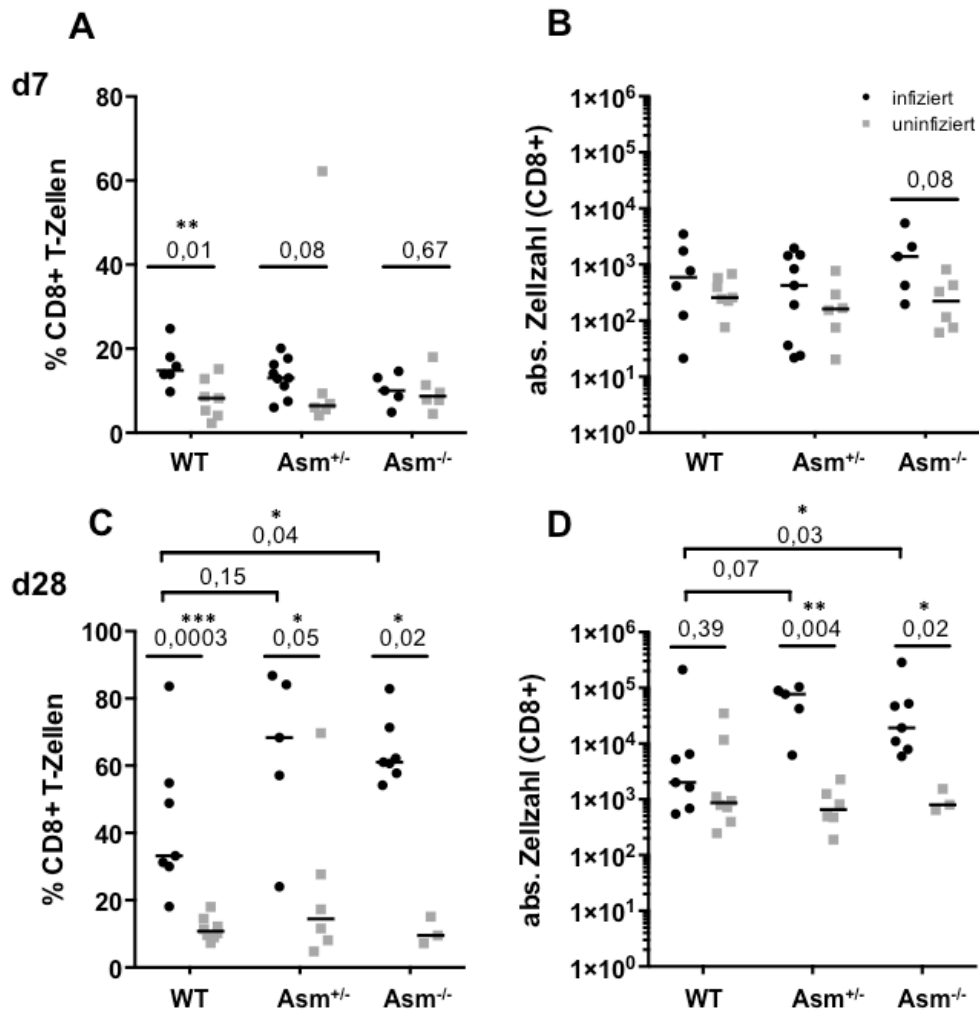


Abb. 23 Analyse der T-Zellfrequenzen und absoluten T-Zellzahlen von CD8⁺ T-Zellen während der akuten und persistenten Phase der Infektion.

(A) Frequenz und (B) absolute Zellzahl von CD8⁺ T-Zellen aus WT, Asm^{+/-} und Asm^{-/-} Mäusen während der Akutphase der Infektion. (C) Frequenz und (D) absolute Zellzahl von CD8⁺ T-Zellen aus WT, Asm^{+/-} und Asm^{-/-} Mäusen während der persistenten Phase nach Infektion. Horizontale Striche entsprechen dem Median von n=5-8 Tieren. Für die statistische Analyse wurde der Mann-Whitney Test benutzt und die p-Werte entsprechend dargestellt; signifikante Werte sind mit Sternchen gekennzeichnet (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

Neben CD8⁺ T-Zellen findet man auch CD4⁺ T-Zellen, d. h. Treg und Tconv Zellen im Gehirn. Die Frequenz von CD4⁺ T-Zellen variierte zwischen infizierten und uninfizierten Mäusen, sowie zwischen den Genotypen, kaum (Abb. 24 A). In infizierten Asm^{-/-} Mäusen kam es gegenüber uninfizierten Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der CD4⁺ T-Zellen (Abb. 24 B). Gleichzeitig war in diesen Mäusen der Anteil der Treg Zellen erniedrigt (Abb. 24 C).

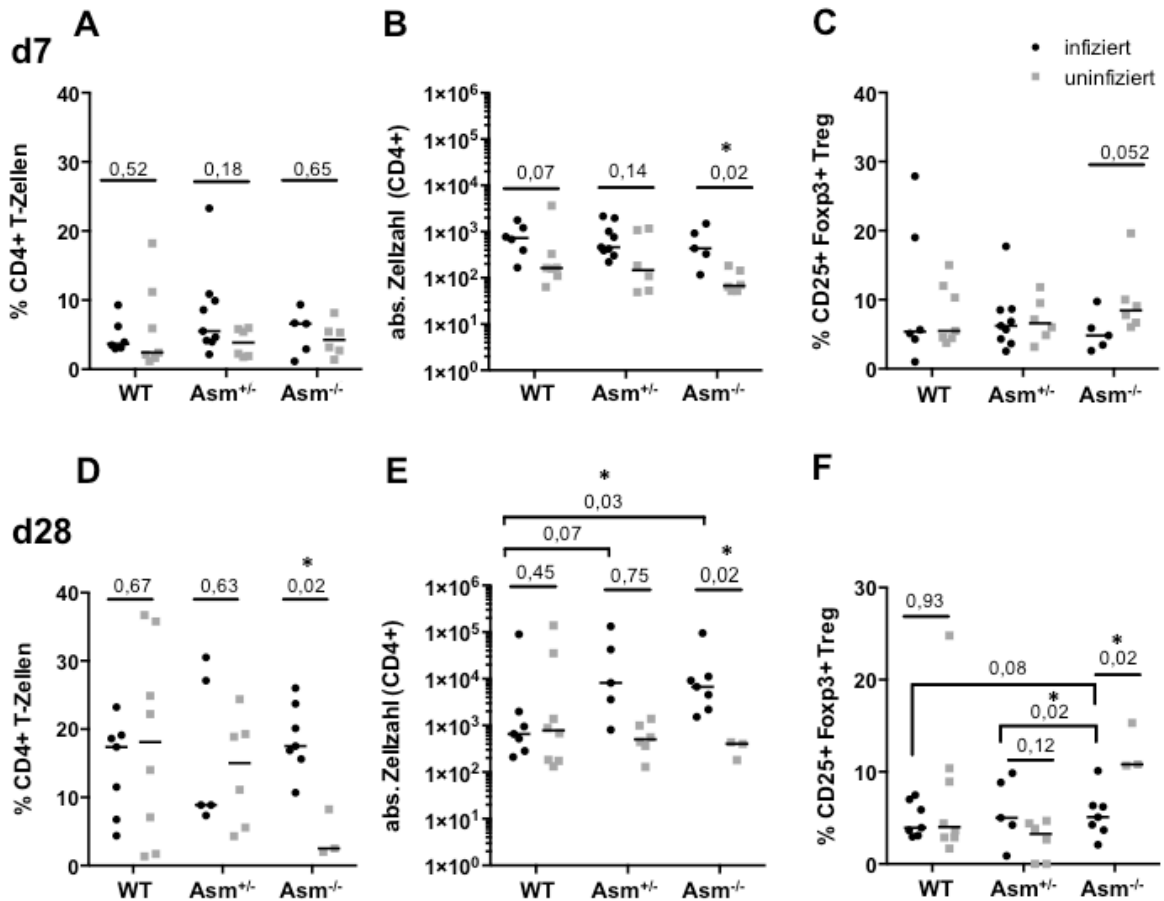


Abb. 24 Analyse der Frequenzen und absoluten T-Zellzahlen von CD4⁺ T-Zellen und Treg Zellen während der akuten und persistenten Phase der Infektion.

(A-C) T-Zellpopulationen während der akuten Phase nach Infektion. **(A)** T-Zellfrequenz und **(B)** absolute Zellzahl von CD4⁺ T-Zellen und **(C)** Frequenz von Treg Zellen aus WT, *Asm*^{+/-} und *Asm*^{-/-} Mäusen. (D-F) T-Zellpopulationen während der persistenten Phase nach Infektion. **(D)** T-Zellfrequenz und **(E)** absolute Zellzahl von CD4⁺ T-Zellen und **(F)** Frequenz von Treg Zellen aus WT, *Asm*^{+/-} und *Asm*^{-/-} Mäusen. Horizontale Striche entsprechen dem Median von n=5-8 Tieren. Für die statistische Analyse wurde der Mann-Whitney Test benutzt und die p-Werte entsprechend dargestellt; signifikante Werte sind mit Sternchen gekennzeichnet (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

In der persistenten Phase der Infektion (d28 dpi) war der Anteil der CD4⁺ T-Zellen innerhalb der CD45⁺ T-Zellen höher als zuvor in der akuten Phase. Bei WT und *Asm*^{+/-} Mäusen waren infizierte und uninfizierte Mäuse vergleichbar, in *Asm*^{-/-} Mäusen, war der Anteil an CD4⁺ T-Zellen in infizierten Mäusen signifikant erhöht (Abb. 24 D). Wie zuvor schon bei den CD8⁺ T-Zellen beobachtet, war die absolute Anzahl von CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu infizierten WT Mäusen in *Asm*^{-/-} Mäusen signifikant höher (Abb. 24 E). In infizierten und uninfizierten WT und *Asm*^{+/-} Mäusen war die Frequenz der Treg Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen unverändert, allerdings gab es in infizierten *Asm*^{-/-} Mäusen eine Reduktion des Anteils an Treg

Zellen auf das Niveau der WT und $Asm^{+/-}$ Tiere (Abb. 24 F). Bei den uninfizierten Tieren zeigte sich wie zuvor (Abb. 12 B), dass $Asm^{-/-}$ Mäuse eine höhere Treg-Frequenz innerhalb der $CD4^{+}$ T-Zellen haben als WT oder $Asm^{+/-}$ Mäuse (Abb. 24 F).

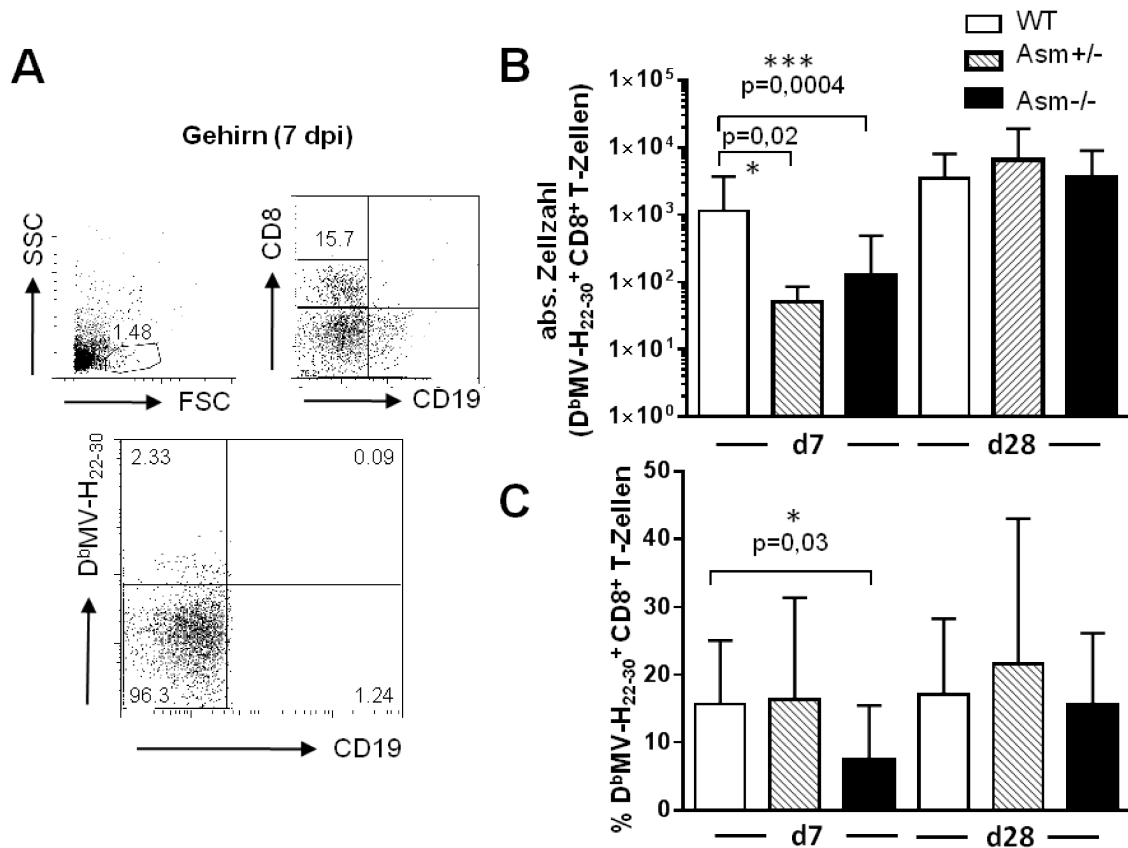


Abb. 25 $Asm^{-/-}$ Mäusen wiesen eine verringerte Anzahl Masern-spezifischer $CD8^{+}$ T-Zellen auf.

(A) Gatingstrategie und repräsentatives Dot Plot eines infizierten Gehirns. Es wurde zunächst auf $CD45^{+}$, lebende Lymphozyten gated und anschließend auf $CD8^{+} CD19^{-}$ T-Zellen und die darin enthaltenen $D^{b}MV_{H22-30}$ -Pentamer $^{+}$ T-Zellen. (B) Bestimmung der absoluten Anzahl von Masernspezifischen $D^{b}MV_{H22-30}$ -Pentamer $^{+} CD8^{+}$ T-Zellen innerhalb der $CD8^{+}$ T-Zellen und (C) der Frequenz der $D^{b}MV_{H22-30}$ -Pentamer-spezifischen Zellen innerhalb der $CD8^{+}$ T-Zellen an Tag 7 bzw. Tag 28 im Gehirn von WT (weiße Balken), $Asm^{+/-}$ Mäusen (graue Balken) und $Asm^{-/-}$ Mäusen (schwarze Balken). Dargestellt wird der Mittelwert und die Standardabweichung der gepoolten Daten aus n= 6 Mäusen pro Gruppe. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigem, ungepaartem Mann-Whitney Test berechnet (*p= 0,05 **p= 0,01 ***p= 0,001). Erstmalige Veröffentlichung der Daten in Hollmann et al. 2016¹³⁶, Abbildungen B und C wurden durch Daten ergänzt und abgeändert.

Obwohl es in der persistenten Phase mehr $CD8^{+}$ T-Zellen in $Asm^{-/-}$ als in WT Mäusen gab, konnte das Masernvirus nicht eliminiert werden, sichtbar anhand der erhöhten Anzahl infizierter Neuronen (Abb. 21 D und E). Daher wurden mit Hilfe des $D^{b}MV_{H22-30}$ -Pentamers MV-spezifische $CD8^{+}$ T-Zellen angefärbt (Abb. 25 A), um die Spezifität der $CD8^{+}$ T-Zellen näher zu analysieren. An Tag 7 konnten wir zuvor keine

Unterschiede zwischen WT und $Asm^{-/-}$ Mäusen bezüglich der gesamten Anzahl der $CD8^{+}$ T-Zellen im Gehirn feststellen (Abb. 23 B). Die Pentamerfärbung zeigte, dass in $Asm^{-/-}$ Mäusen weniger Masernvirusspezifische $CD8^{+}$ T-Zellen während der akuten Phase existierten (Abb. 25 A-D), während die Anzahl in der persistenten Phase vergleichbar war (Abb. 25 E-H). Während die Gesamtanzahl der $CD8^{+}$ T-Zellen in $Asm^{-/-}$ Mäusen während der persistenten Phase anstieg (Abb. 23 D), nahm die Anzahl Masernvirusspezifische $CD8^{+}$ T-Zellen nicht im gleichen Maß zu (Abb. 25). In den drainierenden, zervikalen Lymphknoten von $Asm^{-/-}$ Mäusen zeigte sich in der akuten Phase der Infektion ebenfalls eine Abnahme der Anzahl MV-spezifischer $CD8^{+}$ T-Zellen (nicht gezeigt Daten).

Parallel zur Analyse der T-Zellfrequenzen und absoluten Zellzahlen, wurde auch die Aktivierung und Proliferation untersucht. Generell sind alle T-Zellen im Gehirn $CD44^{hi}$ (nicht gezeigte Daten), da nur aktivierte T-Zellen in der Lage sind, die Bluthirnschranke zu überwinden.

Die Proliferation unterschied sich zwischen infizierten WT, $Asm^{+/-}$ und $Asm^{-/-}$ Mäusen nicht (Abb. 26). In der Akutphase der Infektion waren $CD8^{+}$ T-Zellen aus infizierten Mäusen tendenziell etwas proliferativer als aus uninfizierten Mäusen, dieser Unterschied war jedoch nur in WT Mäusen signifikant (Abb. 26 A). In der persistenten Phase der Infektion differierten weder die Genotypen, noch die Gruppen infiziert vs. uninfiziert (Abb. 26 C und D) bei den $CD8^{+}$ und $CD4^{+}$ T-Zellen. Die Proliferation der $CD8^{+}$ und $CD4^{+}$ T-Zellen variierte hauptsächlich zwischen der akuten und der persistenten Phase der Infektion. In der persistenten Phase der Infektion, an Tag 28, wiesen die T-Zellen eher einen ruhenden, nicht proliferativen Phänotyp auf. Während in der akuten Phase 40-60 % der $CD8^{+}$ und $CD4^{+}$ Zellen proliferierten, waren es in der persistenten Phase nur noch unter 20 % der $CD8^{+}$ und $CD4^{+}$ Zellen.

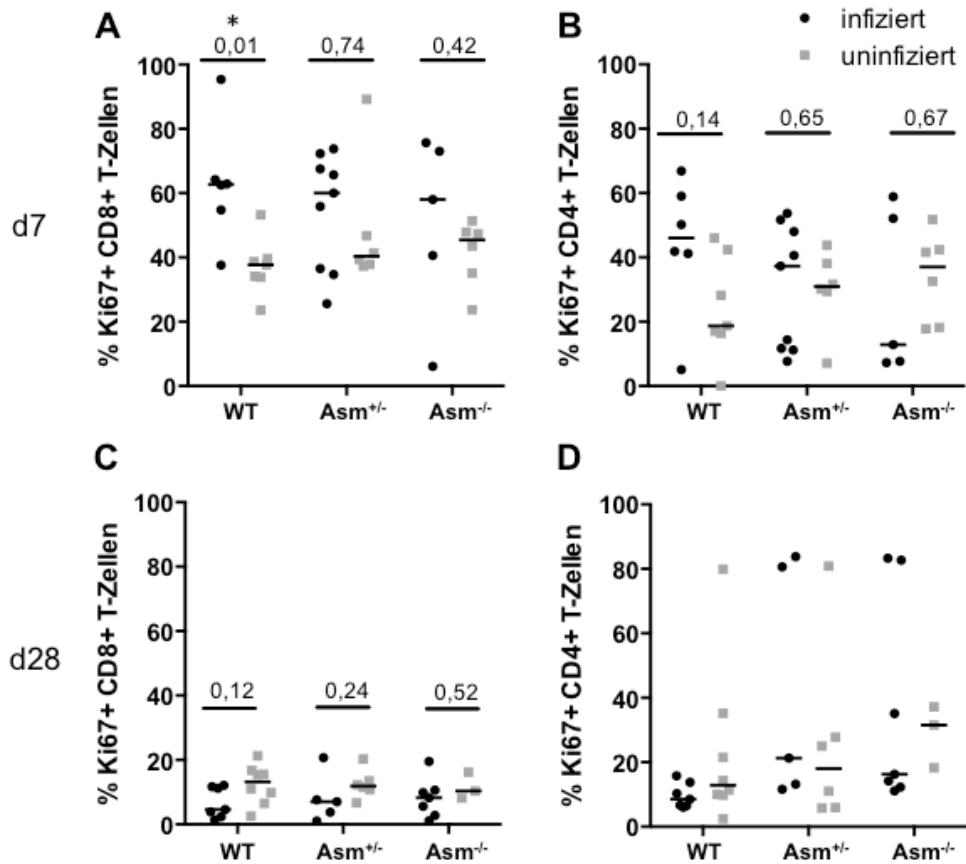


Abb. 26 Aktivierungszustand von T-Zellen im Gehirn während der MV-Infektion.

(A und C) Proliferation von Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen und (B und D) CD8⁺ T-Zellen während der akuten Phase (A und B) und der persistenten Phase (C und D) nach Masernvirusinfektion. Verglichen wurden T-Zellen aus WT, Asm^{+/-} und Asm^{-/-} Mäusen. Dargestellt ist der Median von n=3-8 Tieren und für die statistische Analyse wurde der Mann-Whitney Test benutzt und die p-Werte entsprechend angegeben. Signifikante Werte sind mit Sternchen gekennzeichnet (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

Zusammenfassend zeigte sich, dass WT und Asm^{-/-} Mäuse sich hinsichtlich ihrer Immunantwort nach MV-Infektion unterschieden. Asm^{-/-} Mäuse hatten weniger MV-spezifische CD8⁺ T-Zellen in der akuten Phase. Obwohl sich die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen selektiv in Asm^{-/-} Mäusen in der persistenten Phase erhöhte, stieg die Anzahl MV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nicht entsprechend an.

4.5.3. Behandlung von MV-infizierten Mäusen mit Amitriptylin imitierte den Krankheitsverlauf von Asm^{-/-} Mäusen

Es konnte demonstriert werden, dass sowohl genetische Deletion der Asm als auch die Behandlung mit dem Asm-Inhibitor Amitriptylin zu einem Anstieg der Treg-Frequenz führten (Abb. 12 B und Abb. 16 B). Demzufolge sollten Amitriptylin-behandelte WT Mäuse nach Infektion mit dem Masernvirus einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie Asm^{-/-} Mäusen aufweisen. Um dies zu untersuchen, wurden

wildtypische Mäuse im Alter von 2 Wochen intrazerebral infiziert und in der persistenten Phase der Virusinfektion ab Tag 14 mit Amitriptylin oder NaCl-Lösung als Kontrolle behandelt. Bei der Analyse der Hirnschnitte zeigte sich, dass nach Amitriptylinbehandlung mehr infizierte Neuronen detektiert werden konnten als bei Kontroll-behandelten Tieren (Abb. 27 A). Das T-Zellkompartiment war jedoch zwischen den Gruppen nicht verändert. Die Gesamtanzahl der CD8⁺ T-Zellen unterschied sich zwischen der Kontroll-behandelten und Amitriptylin-behandelten Gruppe nicht (Abb. 27 B). Auch in Hinsicht auf die Masernspezifischen CD8⁺ T-Zellen gab es keine Unterschiede bezüglich der Frequenz und auch der Anzahl an Masernvirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Abb. 27 C und D).

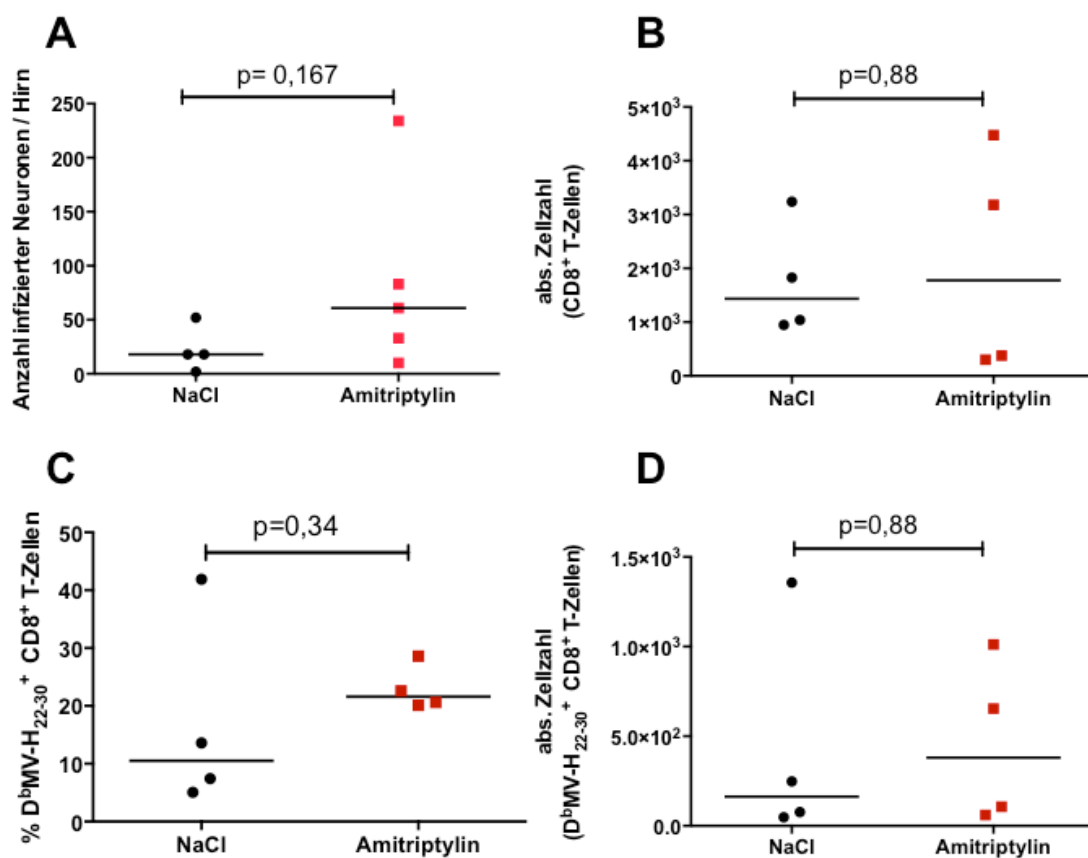


Abb. 27 Verstärkte Maserninfektion während der persistenten Phase durch Amitriptylinbehandlung von MV-infizierten WT Tieren im Vergleich zu Kontroll-behandelten Tieren.

WT Mäuse wurden im Alter von 2 Wochen infiziert und ab Tag 14 zweimal täglich mit Amitriptylin oder NaCl-Lösung behandelt. Dargestellt ist (A) die Anzahl infizierter Neuronen, (B) die absolute Anzahl der gesamten CD8⁺ T-Zellen, (C) die Frequenz und (D) die absolute Anzahl der Masernvirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Horizontale Striche entsprechen dem Median von n=4 Tieren. Für die statistische Analyse wurde der Mann-Whitney Test benutzt und die p-Werte entsprechend dargestellt.

4.5.4. Eine Erhöhung der Infektionsrate durch Amitriptylin war nur in Gegenwart von Regulatorische T-Zellen möglich

Als nächstes sollte untersucht werden, weshalb $Asm^{-/-}$ Mäuse die Virusinfektion schlechter kontrollieren konnten. Wie vorherige Experimente gezeigt hatten (Abb. 10-13), beeinflusste die Asm -Aktivität sowohl die Frequenz als auch die Funktionalität von regulatorischen T-Zellen. In der Infektionskontrolle spielen regulatorische T-Zellen eine Rolle, indem sie die Effektor-T-Zellen und Zytotoxischen T-Zellen, welche für die Virusbeseitigung zuständig sind, in ihrer Aktivierung und Expansion kontrollieren¹⁴⁹. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Treg Zellen den Verlauf der Maserninfektion beeinflussen¹¹². Bei Deletion der Treg Zellen in DEREK Mäusen verringerte sich die Stärke der Maserninfektion, wohingegen die Erhöhung der Treg Zellen mittels des CD28-Superagonisten D665 die Maserninfektion verschlechterte. In diesem Versuch wurden keine DEREK Mäuse¹⁵⁰, sondern Foxp3-DTR Mäuse¹³⁵ verwendet, weil Letztere durch Knock-in Mutation entstanden sind und der Phänotyp nach Treg Depletion ähnlich dem dem von Scurfy Mäusen (Foxp3 Knockout) Mäusen ist. Es gilt zu beachten, dass diese Mäuse durch die fehlenden Treg Zellen eine lymphoproliferative Erkrankung entwickeln, weswegen die Treg Zellen nur über einen kurzen Zeitraum von 7 Tagen depletiert wurden. Im neuen Versuch wurden nun WT und Foxp3-DTR transgene Männchen infiziert und ab dem Tag 21 mit Amitriptylin oder Kochsalzlösung als Kontrollgruppe behandelt. Die Treg Zellen wurden mittels Diphtherietoxingabe an Tag 21 und 22 sowie Tag 24 und 26 erfolgreich depletiert (siehe Abb. 28 A und B). Aufgrund der Depletion der Treg Zellen und der einhergehenden Lymphoproliferation waren die Lymphknoten und teilweise die Milzen vergrößert und die Organe wiesen höhere Zellzahlen auf (nicht gezeigte Daten;^{151,135}). Wie in der Literatur bereits beschrieben^{135,152} war der Anteil der aktivierten $CD25^{+}$ Foxp3 $^{-}$ Tconv Zellen unter den $CD4^{+}$ T-Zellen erhöht (Abb. 28 B).

Wie zuvor in $Asm^{-/-}$ Mäusen gezeigt (Abb. 27 A), führte die Amitriptylinbehandlung in WT Mäusen zu einer signifikant gesteigerten Anzahl von infizierten Neuronen (Abb. 28 C). In Abwesenheit von Treg Zellen in DT-behandelten Foxp3-DTR Mäusen führte Amitriptylin nicht zu einer entsprechenden Zunahme von infizierten Neuronen (Abb. 28 C).

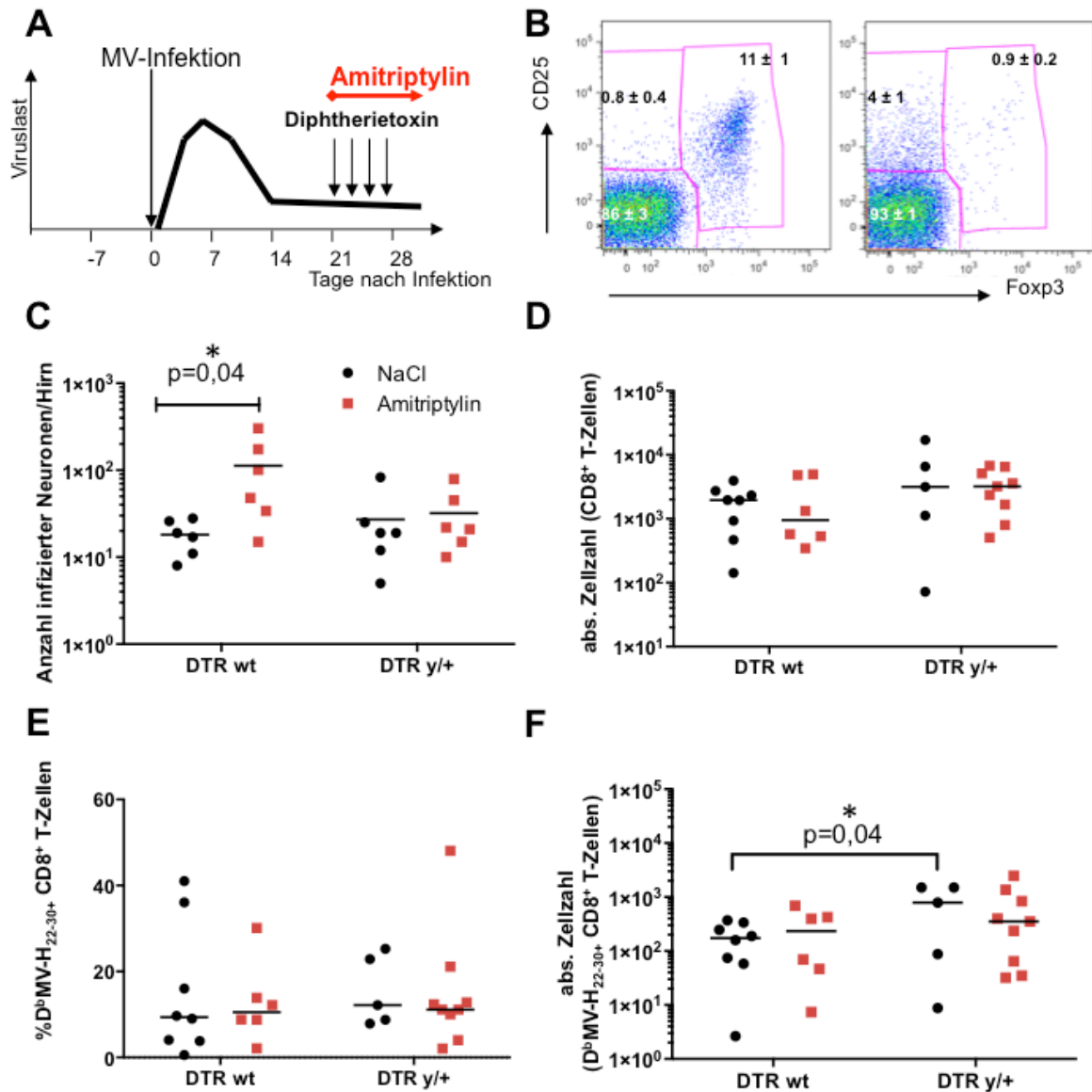


Abb. 28 Verstärkte Maserninfektion in Abhängigkeit von Treg Zellen und Amitriptylinbehandlung.

(A) Schematische Darstellung des Experiments. WT und Foxp3-DTR Geschwistertiere wurden im Alter von zwei Wochen mit Masernviren infiziert, ab Tag 21 nach Infektion wurden die Treg Zellen mittels Diphtherietoxin depletiert (d21, d22, d24 und d26 dpi) und täglich zweimal mit Amitriptylin oder Kochsalzlösung behandelt. (B) FACS-Analyse der CD25 und Foxp3 Expression in CD45⁺CD4⁺ Milz T-Zellen. Zahlenwerte entsprechen dem Mittelwert aus n=5-6 Tieren mit Standardabweichung. (C) Anzahl infizierter Neuronen, (D) Anzahl der gesamten CD8⁺ T-Zellen, (E) Frequenz von D^bMV_{H22-30}-Pentamer⁺ CD8⁺ T-Zellen und (F) Anzahl der D^bMV_{H22-30}-Pentamer⁺ CD8⁺ T-Zellen im Hirn von Amitriptylin- (rot) und NaCl- (schwarz) behandelten WT und Foxp3-DTR Mäusen. Die Grafiken stellen den Median und die einzelnen Werte von n=5-8 Tieren dar. Für die statistische Auswertung wurde der Mann Whitney Test verwendet. Signifikante Werte sind mit Sternchen gekennzeichnet (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001). Erstmalige Veröffentlichung der Daten A-C in Hollmann et al. 2016¹³⁶.

Die Analyse der T-Zellen zeigte, dass sich die absolute Anzahl der CD8⁺ T-Zellen sowohl zwischen WT und Foxp3-DTR Tieren als auch zwischen den Behandlungsgruppen, mit und ohne Amitriptylin, nicht unterschieden (Abb. 28 D). Ebenfalls gab es keine Differenzen bezüglich der Frequenz der D^bMV_{H22-30}-Pentamer⁺ CD8⁺ T-Zellen (Abb. 28 E). Allerdings gab es im Vergleich von kontrollbehandelten WT Mäusen zu kontrollbehandelten Foxp3-DTR Mäusen in Letzteren in Abwesenheit von Treg Zellen eine signifikante Erhöhung der absoluten Masernvirus-spezifische CD8⁺ T-Zellen. Dies war nicht der Fall in der Amitriptylin-behandelten Gruppe.

Folglich gab es in Anwesenheit von Treg Zellen unter Amitriptylinbehandlung einen Anstieg der infizierten Neuronen (Abb. 28 C). Dieser konnte jedoch nicht durch eine verringerte Frequenz oder Anzahl an Masernvirusspezifischen T-Zellen erklärt werden (Abb. 28 E und F). Möglich, aber nicht untersucht, ist, dass die Treg Zellen die Funktionalität der masernvirusspezifischen T-Zellen beeinflussen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass Asm^{+/-} und Asm^{-/-} Mäuse mehr infizierte Neuronen hatten als WT Mäuse und dass dieser Effekt durch Amitriptylinbehandlung ebenfalls erreicht werden konnte. In der Akutphase der Infektion gab es in Asm^{-/-} Mäusen weniger MV-spezifische CD8⁺ T-Zellen als in WT Tieren. In der persistenten Phase gab es in Asm^{+/-} und Asm^{-/-} sogar mehr CD8⁺ T-Zellen als in WT Tieren, jedoch stieg weder der Anteil noch die absolute Anzahl der MV-spezifische CD8⁺ T-Zellen im gleichen Maß an. Treg Zellen könnten den Verlauf der Infektion beeinflussen, da in Abwesenheit von Treg Zellen und unter Amitriptylinbehandlung es nicht zu einem Anstieg von infizierten Neuronen kam. Die Abwesenheit der Treg Zellen hatte keine Auswirkungen auf die Frequenz oder Anzahl von MV-spezifische CD8⁺ T-Zellen, allerdings möglicherweise auf die Funktionalität der Zellen.

5. Diskussion

Trotz großer Fortschritte im Verständnis der Funktionsweise und Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase, ist deren mechanistische Funktion während der adaptiven Immunantwort nach wie vor unklar. Die vorliegende Arbeit untersucht die Bedeutung der sauren Sphingomyelinase für die Funktionsweise von T-Zellen sowie für die Regulation der anti-viralen T-Zellantwort. Die Ergebnisse zeigen, dass für eine Beantwortung der Frage regulatorische und konventionelle T-Zellen unterschieden werden müssen. Grundsätzlich variierten die beiden Zellarten durch Unterschiede in der Asm Aktivität, im Ceramidgehalt und in der Lipidordnung. Treg Zellen waren im Vergleich zu Tconv Zellen gegenüber den Effekten von genetischer oder pharmakologischer Inhibition resistenter. Die unterschiedliche Wirkung der Asm Abwesenheit könnte man therapeutisch ausnutzen, um das Treg-Tconv Gleichgewicht zu verschieben. Eine selektive Unterdrückung der Tconv Antwort ohne negative Beeinflussung der Treg Zellen ist von therapeutischem Nutzen bei Autoimmunerkrankungen.

5.1. Unterschiede im Ceramidgehalt und der Lipidordnung in Treg und Tconv Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass Treg Zellen im Vergleich zu Tconv Zellen eine erhöhte Menge an Ceramid aufwiesen (Abb. 7). Naheliegender wäre, dass dies auf die erhöhte Asm Aktivität in Treg Zellen (Abb. 6 B) zurückzuführen ist. Ein möglicher weiterer Grund für die Treg-spezifische Akkumulation von intrazellulärem Ceramid ist die Sphingomyelin Synthetase 1 (*Sgms1*)¹⁵³. *Sgms1* wird direkt durch Foxp3 reguliert, d. h. das Vorliegen von Foxp3 in Treg Zellen oder Foxp3 Überexpression verringert die Expression von *Sgms1*. *Sgms1* katalysiert die Spaltung von Ceramid und Phosphatidylcholin zu Diacylglycerol und Sphingomyelin. Folglich könnte die Foxp3-vermittelte Suppression von *Sgms1* die Akkumulation von Ceramid in Treg Zellen erklären¹⁵³. Massenspektroskopische Analysen von Treg Zellen aus *Asm*^{-/-} Mäusen zeigten, dass diese sogar mehr Ceramid als WT Treg Zellen besaßen (Abb. 7 B, Abb. 29). Das generell *Asm*^{-/-} Zellen mehr Ceramid haben, wurde bereits in der Literatur gezeigt²⁷. Die Erklärung für das Paradoxon, dass mehr Ceramid vorhanden ist, obwohl Sphingomyelin durch das Fehlen der Asm nicht mehr zu Ceramid umgesetzt werden kann, liefern kompensatorische Mechanismen. Zum einen kann

Ceramid *de novo* über die Ceramidsynthetase generiert werden. Zum anderen bauen andere Sphingomyelinasen (z.B. Nsm) Sphingomyelin in nicht-lysosomalen Kompartimenten ab. Und drittens, wird Ceramid normalerweise schnell zu Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat umgesetzt, da Ceramid in größeren Menge zelltoxisch ist und pro-apoptotisch wirkt. Diese späteren Abbauege könnten ebenfalls betroffen sein und so zu einer Anreicherung von Ceramid führen ²⁷. Wie schon beschrieben, weichen die Ergebnisse der Massenspektroskopie und des Einbaus durch Click-Chemie-konjugierter Ceramide in Treg Zellen ab. Treg Zellen aus $Asm^{-/-}$ Mäusen hatten mehr Ceramid als WT Treg Zellen, allerdings bauten $Asm^{-/-}$ Treg Zellen tendenziell weniger clickbares Ceramid als WT Treg Zellen ein. Die Diskrepanz hinsichtlich des Ceramidgehalts zwischen beiden Methoden kann damit begründet werden, dass die Zellen unterschiedlich aufgearbeitet wurden. Bei der Massenspektroskopie wurde die Zelle als Ganzes lysiert und analysiert. Bei der Click-Chemie hingegen wurde nur Ceramid in der äußeren Plasmamembran berücksichtigt. Nachdem die Lage von Ceramid von funktioneller Bedeutung ist, bringt die Click-Chemie der Massenspektroskopie gegenüber Vorteile. Die Click-Chemie ist noch in der Entwicklung, aber es wird bereits versucht, Sphingomyelin mit zwei clickbaren Einheiten zu entwickeln. Damit könnte man den Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid am Mikroskop direkt mitverfolgen.

Ceramid beeinflusst durch die Bildung von Mikrodomänen auch die Lipidordnung in der Membran von Zellen. Sowohl naive WT als auch $Asm^{-/-}$ Tconv Zellen hatten vor allem Membranen mit einer hohen Lipidordnung. Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur, wo bereits gezeigt werden konnte, dass Zellen mit hoher Lipidordnung naive, nicht-aktivierte Zellen sind. Eine hohe Lipidordnung, wie sie bei naiven T-Zellen zu sehen ist, fördert außerdem die T-Zell Aktivierung durch Ausbildung von stabilen Synapsen mit APCs ⁵⁹. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen mit einer niedrigen Lipidordnung einen aktivierten Phänotyp, gekennzeichnet durch eine hohe Expression von CD69, einem frühen Aktivierungsmarker, und CD25 ⁵⁹. Dieser aktivierte Phänotyp ist typisch für Effektor-Tconv Zellen und Treg Zellen. Allerdings unterschieden sich Treg Zellen aus WT und $Asm^{-/-}$ Mäusen hinsichtlich der Lipidordnung: die Hälfte der WT Treg Zellen hatten Membranen mit einer niedrigen Lipidordnung, während $Asm^{-/-}$ Treg, ähnlich wie die Tconv Zellen, vor allem

Membranen mit einer hohen Lipidordnung aufwiesen. Wie bereits in der Literatur gezeigt, sind Zellen mit hoher Membranlipidordnung proliferativer⁵⁹. Die $Asm^{-/-}$ Treg, welche im Vergleich zu WT Treg eine höhere Lipidordnung aufwiesen, waren in Übereinstimmung damit insgesamt tendenziell proliferativer (Milz, nicht gezeigte Daten), stärker aktiviert (Abb. 13) und stärker suppressiv (Abb. 10). Entsprechend dazu hatten auch $Asm^{-/-}$ Tconv Zellen nochmal mehr Zellen mit hoher Lipidordnung (92 %) als Tconv aus WT Mäusen (76 %) (Abb. 9) und sollten stärker proliferativ sein. Es konnte in einer anderen Arbeit demonstriert werden, dass sich in $Asm^{-/-}$ Mäusen mehr Zellen in der G0/G1 Phase befinden und es sich folglich um proliferative Zellen handelt (Zhou et al. 2016).

Ein Grund für die erhöhte Lipidordnung in $Asm^{-/-}$ Zellen könnte die veränderte Membranzusammensetzung als Folge der Asm -Defizienz sein. Durch die fehlende Funktion der Asm war Sphingomyelin in der Membran angereichert (Abb. 7 C) und das Verhältnis von Ceramid zu Sphingomyelin verändert (Abb. 7 E). Die abweichende Membranzusammensetzung und -ordnung wiederum beeinflussen intrazelluläre Signalwege und könnten mögliche Veränderungen in der Funktion, z.B. die Treg Suppression, erklären.

5.2. Asm Defizienz oder Inhibition hatte Auswirkungen auf das Treg Kompartiment und die Treg Funktion

$Asm^{-/-}$ Treg Zellen wiesen im Vergleich zu WT Treg Zellen eine stärkere Suppressivität auf. Eine mögliche Erklärung könnte der unterschiedliche Ceramidgehalt zwischen $Asm^{-/-}$ und WT Treg Zellen sein. Akkumulation von intrazellulärem Ceramid aktiviert die Protein Phosphatase 2A (PP2A) in Treg Zellen. PP2A inhibiert den mTORC1 Signalweg über den unter anderem Zellproliferation, Zellmetabolismus, Zytokinproduktion und T-Zelldifferenzierung reguliert wird, sowie die Generierung und Funktion von Treg Zellen¹⁵³. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang von Ceramid, PP2A und der Treg Suppressivität gibt¹⁵³. In Treg Zellen, die ceramidreich sind, ist PP2A aktiv und inhibiert mTORC1, sodass die Treg Zellen funktionsfähig sind. In Abwesenheit von PP2A entfällt die Hemmung auf mTORC1. Es konnte gezeigt werden, dass PP2A-defiziente Treg Zellen schlecht supprimieren und PP2A-defiziente Mäuse lymphoproliferative Erkrankungen aufweisen¹⁵³. Die PP2A Aktivität wurde indirekt

über die CD98 Expression in WT und $Asm^{-/-}$ Treg Zellen verglichen. CD98 wird durch mTORC1 reguliert und eine hohe PP2A Aktivität würde sich entsprechend in einer geringen Expression von CD98 widerspiegeln. Die CD98 Expression wurde auf gegateten Treg und Tconv Zellen von Milz und Lymphknoten aus WT und $Asm^{-/-}$ Mäusen verglichen. Allerdings konnten keine Unterschiede festgestellt werden (nicht gezeigte Daten). Die erhöhte Ceramidmenge in $Asm^{-/-}$ Treg Zellen im Vergleich zu WT Zellen, hat in diesem Fall nicht zu einer erhöhten PP2A Aktivität geführt, was die erhöhte Suppressionsfähigkeit der Zellen erklären könnte.

Eine weitere mögliche Erklärung für die verstärkte Suppression von Indikatorzellen durch $Asm^{-/-}$ Treg Zellen, ist eine Variation im CTLA-4 Umsatz. In Treg Zellen aus $Asm^{-/-}$ Mäusen wird im gleichen Zeitraum mehr CTLA-4 zur Oberfläche transportiert als in WT Treg Zellen. Im WT scheint die Präsenz der Asm in Lysosomen zu einem verringerten CTL-4 Transport an die Oberfläche zu führen (Abb. 29). Die erhöhte CTLA-4 Expression nach Amitriptylinbehandlung und die gesteigerte CTLA-4 Umsatzrate bei Asm Defizienz könnte zudem im Zusammenhang mit einer erhöhten T-Zellrezeptorstimulation in Abwesenheit der Asm stehen. Es konnte gezeigt werden, dass der Kontakt mit Antigen-präsentierenden Zellen und die daraus resultierende T-Zellrezeptorbindung die Oberflächenexpression von CTLA-4 induziert ¹⁵⁴.

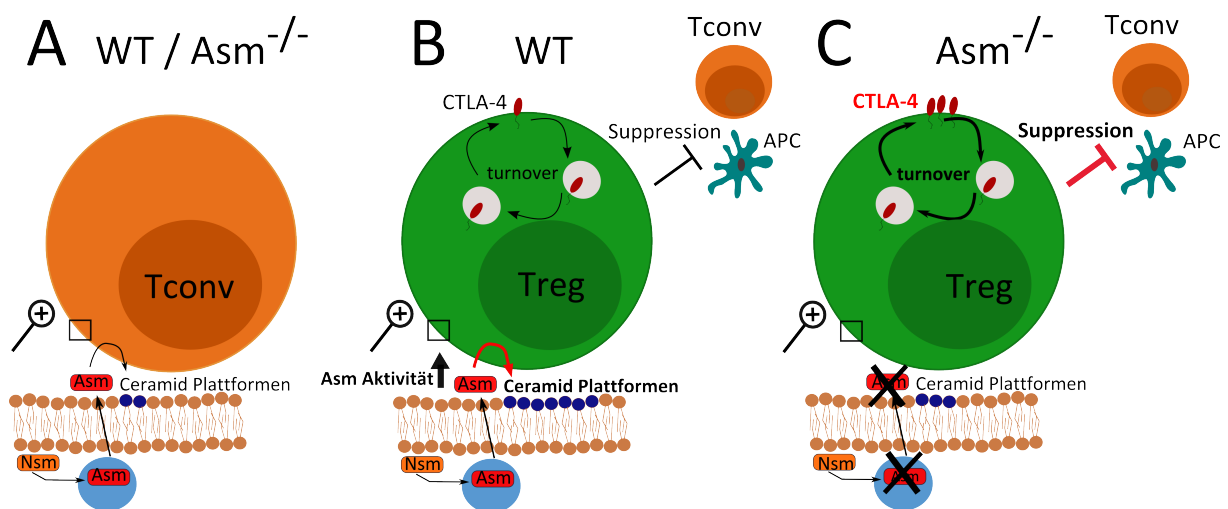


Abb. 29 Schematische Darstellung der Eigenschaften von Treg und Tconv Zellen aus WT und $Asm^{-/-}$ Mäusen

(A) WT und $Asm^{-/-}$ Tconv Zellen haben weniger Ceramid in der Membran als die entsprechenden (B) WT Treg Zellen und (C) $Asm^{-/-}$ Treg Zellen. $Asm^{-/-}$ Treg Zellen können Tconv Zellen stärker supprimieren als WT Treg Zellen. Eine Ursache dafür könnte der erhöhte CTLA-4 Umsatz in $Asm^{-/-}$ Treg Zellen sein.

Des Weiteren haben Asm-defiziente Mäuse eine relativ erhöhte Treg-Frequenz, welche sich mit zunehmenden Alter verstärkt (Abb. 12 D). Die erhöhte Treg-Frequenz in Asm^{-/-} Mäusen konnte vor kurzem auch von anderen nachgewiesen werden¹⁵⁵. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass *in vitro* die Induktion von Treg Zellen mittels TGFβ und IL-2 aus naive Asm^{-/-} CD4 T-Zellen erhöht war. Grund hierfür ist, dass induzierte Treg Zellen aus Asm^{-/-} Mäusen weniger Rictor, mTORC1, pS6 Kinase und AKT Signalmoleküle aufweisen, welche normalerweise die iTreg Induktion dämpfen. Entsprechend scheint die Asm ein negativer Regulator für natürliche und induzierte Treg Zellen zu sein¹⁵⁵.

Die erhöhte Treg-Frequenz war nicht auf eine Expansion der Treg Zellen zurückzuführen sondern auf eine Abnahme der absoluten Tconv Zellzahl. Zwar waren die Asm^{-/-} Treg Zellen stärker aktiviert, allerdings konnte keine Expansion von Treg Zellen festgestellt werden (Abb. 30 A). Grund dafür könnte die gesteigerte CTLA-4 Expression und Umsatzrate in Asm^{-/-} Tregs sein. Es konnte gezeigt werden, dass es in adulten CTLA-4 defizienten Mäusen zu einer starken Expansion von Treg und Tconv Zellen kommt¹⁵⁶. Das heißt, dass CTLA-4 nicht nur Tconv Zellen reguliert, sondern auch die Expansion von Treg Zellen.

Da genetische Knockouttiere den Nachteil haben, dass sich Kompensationsmechanismen entwickeln können, wurde eine kurzzeitige Asm Blockade durch Amitriptylin und Desipramin induziert. Amitriptylin wurde in der *in vivo* Behandlung benutzt, da dieses im Gegensatz zu Desipramin noch als Medikament zugelassen ist und etwas länger auf dem Markt ist. *In vitro* wurden sowohl Amitriptylin als auch Desipramin getestet, gezeigt sind allerdings nur die *in vitro* Daten mit Desipramin. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* resultierte die Asm Inhibition in einer relativen Erhöhung der Treg-Frequenz, in Folge einer Abnahme der absoluten Tconv Zellzahl. Die Daten sind in Übereinstimmung mit publizierten Ergebnissen, die in einem Mausmodell für allergische Rhinitis zeigen, dass die Behandlung mit Desipramin zu einem leichten Anstieg der Treg-Frequenz führt, während es bei Th17 Zellen zu einer starken Abnahme kommt⁷².

In anderen Arbeiten konnte bereits demonstriert werden, dass trizyklische Inhibitoren, wie Amitriptylin und Desipramin, Apoptose-induzierende Effekte haben^{71,145}. In

der vorliegenden Arbeit scheint der Effekt der Asm Blockade unterschiedlich auf die einzelnen Zelltypen zu wirken (Abb. 30 B). Eine mögliche Erklärung für die differenzielle Wirkung der Asm Inhibition liefern die *in vitro* Versuche. Nur in Gegenwart von IL-2 waren die Treg Zellen geschützt, in Abwesenheit von IL-2 führte die Asm Blockade in Treg Zellen ebenfalls zu einer Abnahme der Zellzahl äquivalent zu den Tconv Zellen. Im Gegensatz zu Tconv Zellen haben Treg Zellen den hochaffinen IL-2 Rezeptor. Die Bindung von IL-2 an den Rezeptor induziert die Freisetzung von Zink aus Lysosomen und resultiert in der Aktivierung von STAT5. STAT5 Expression wiederum schützt vor Apoptose^{157,158}. Es konnte gezeigt werden, dass IL-2 das T-Zellüberleben fördert, indem es anti-apoptotisches Bcl-XL hochreguliert^{159,160}. Auch *in vivo* scheinen die Treg Zellen durch Überlebenssignale wie IL-2, CD28, TZR Signal geschützt zu sein.

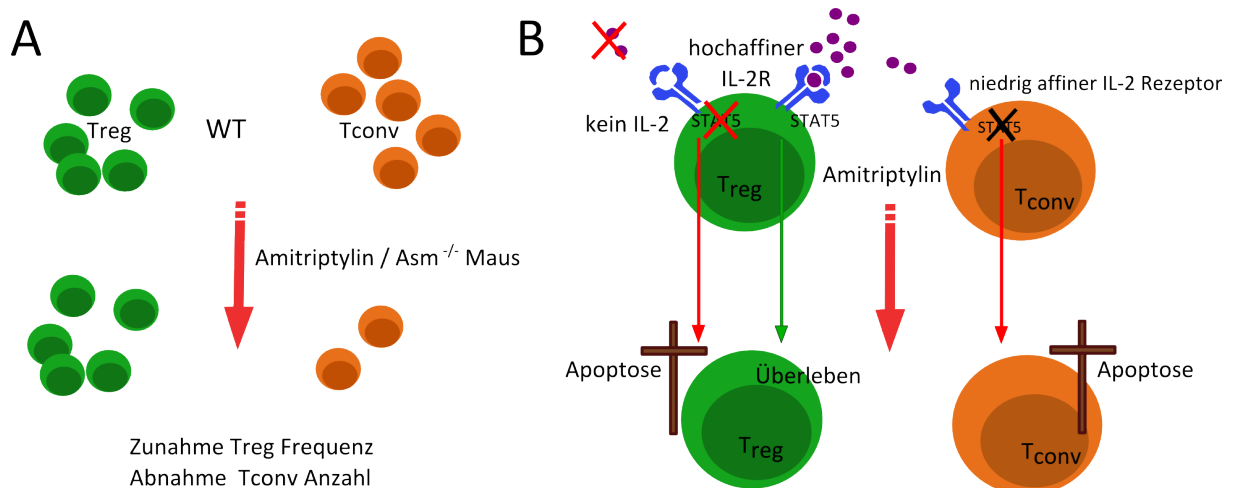


Abb. 30 Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Amitriptylin auf Treg und Tconv Zellen

(A) Genetische Defizienz der Asm oder Hemmung der Asm durch Inhibitoren wie Amitriptylin führt zu einer Zunahme der Treg-Frequenz, welche auf einer Abnahme der absoluten Anzahl der Tconv Zellen beruht. (B) Auf molekularer Ebene verantwortlich für das selektive Überleben von Treg und Tconv Zellen nach Amitriptylinbehandlung ist vermutlich IL-2. Tconv Zellen, die keinen hochaffinen IL-2 Rezeptor besitzen, gehen in Apoptose. Treg Zellen sind aufgrund ihres hochaffinen IL-2 Rezeptors, der induzierten STAT5-Phosphorylierung und anti-apoptotischen Wirkung in Anwesenheit von IL-2 vor den apoptotischen Effekten des Inhibitors geschützt. In Abwesenheit von IL-2 gehen auch Treg Zellen in Apoptose.

Eine leichte Abweichung der Ergebnisse gab es im Transferexperiment im Vergleich zu Amitriptylin-behandelten WT Mäusen. Wenn WT Zellen in Asm-defiziente Mäuse transferiert wurden und diese anschließend mit Amitriptylin behandelt wurden kam es zwar zu einer Abnahme der Tconv Zahlen, aber nicht zu einem Anstieg der Treg-

Frequenz (Abb. 17). Im Transferexperiment müssen die WT Treg Zellen mit den endogenen $Asm^{-/-}$ Treg Zellen um das vorhandene IL-2 konkurrieren, wobei die $Asm^{-/-}$ Treg in Anzahl und Frequenz überlegen sind. Die Anzahl $Asm^{-/-}$ Treg Zellen war bei Amitriptylin-Behandlung unverändert, die WT Treg Zellzahl nahm dagegen leicht ab. Diese Abnahme, ausschließlich im Transferexperiment, könnte damit zusammenhängen, dass die WT Treg nicht ausreichend schützendes IL-2 zur Verfügung haben und daher auch anfällig für die apoptotischen Effekte des Inhibitors sind, wie dies *in vitro* der Fall war.

Die Apoptose von Tconv Zellen und dem damit verbundenen Anstieg der Treg-Frequenz könnte auch auf Veränderungen in der sauren Ceramidase zurückgeführt werden. Inhibitoren wie Amitriptylin und Desipramin hemmen nicht nur selektiv die Asm sondern auch die saure Ceramidase ¹⁶¹, da das Prinzip der Inhibitoren auf Verdrängung von der Membran durch die protonierte Form der Inhibitoren beruht ¹⁴. Die saure Ceramidase wandelt Ceramid zu Sphingosin um, welches pro-apoptotische Wirkung hat ^{4,47}. Durch die bivalente Wirkung der Inhibitoren sowohl auf die Asm als auch auf die saure Ceramidase können die Effekte sowohl auf eine Veränderung des Ceramidgehalts, als auch das entstehende Sphingosin zurückgehen. Das dennoch der apoptotische Effekt vorwiegend auf die Asm zurückzuführen ist, kann aus der Tatsache geschlossen werden, dass Desipramin keine Apoptose in $Asm^{-/-}$ Tconv Zellen induzierte, sondern nur in WT Tconv Zellen. Im Fall einer Wirkung von Desipramin auf die saure Ceramidase müsste die Apoptose in An- und Abwesenheit vom Inhibitor verändert sein, was nicht gegeben war.

Im Mausmodell sind nach Asm Inhibitorbehandlung die *in vitro* Ergebnisse auf die *in vivo* Versuche übertragbar. Bei *in vitro* Behandlung von humanen Zellen mit trizyklischen Inhibitoren kommt es ebenfalls zu einer Erhöhung der Treg-Frequenz ¹⁶². Daher kann man vermuten, dass eine therapeutische Behandlung mit ASM Inhibitoren bei Menschen ebenfalls das Treg Kompartiment positiv beeinflussen würde. Treg Zellen sind in Patienten mit Depressionen vermindert ¹⁶³ und durch eine Behandlung mit Antidepressiva steigen die Treg-Frequenzen wieder an ¹⁶⁴. Allerdings ist noch nicht bewiesen, was Ursache und Wirkung ist. Der Anstieg der Treg Zellen nach Behandlung kann direkt durch den Wirkstoff und die Asm Blockade

zustände kommen oder sekundär aus einer Verbesserung der Depression im Allgemeinen resultieren. Eine Verschiebung des Treg-Tconv Verhältnisses durch eine potenzielle Therapie mit trizyklischen Antidepressiva wäre bei verschiedenen Krankheiten, z.B. Autoimmunerkrankungen günstig. So konnte bereits in $Asm^{-/-}$ Mäusen gezeigt werden, dass diese weniger stark Hepatitis entwickeln als WT Mäuse ¹⁶⁵.

Vermutlich könnte nicht nur das Treg zu Tconv Zellen Verhältnis durch Amitriptylinbehandlung verändert werden, sondern auch die Suppressivität von Treg Zellen. Wie im Ergebnisteil gezeigt, waren Treg Zellen aus $Asm^{-/-}$ Mäusen suppressiver als WT Treg Zellen. Nachdem auch in anderen Versuchen der Phänotyp der $Asm^{-/-}$ Maus durch eine Amitriptylinbehandlung widergespiegelt werden konnte, wäre zu vermuten, dass die Behandlung mit trizyklischen Inhibitoren auch die Suppressivität von Treg Zellen beeinflussen kann.

5.3. Einfluss der Asm auf die anti-virale Immunantwort nach Maserninfektion

Wie bereits publiziert wurde, beeinflussen Treg Zellen den Verlauf einer Masernvirusinfektion ¹¹². Eine Erhöhung der Treg-Frequenz durch CD28-Superagonist-Behandlung führt zu einer schlechteren Kontrolle der Maserninfektion, während die Depletion von Treg Zellen den Krankheitsverlauf verbessert ¹¹². Im Rahmen dieses etablierten Infektionsmodells wurden auch $Asm^{-/-}$ Mäuse untersucht. Im Vergleich zu WT Mäusen zeigten $Asm^{-/-}$ Mäuse eine verschlechterte Kontrolle der Maserninfektion, sichtbar anhand der erhöhten Anzahl infizierter Neuronen (Abb. 21 D und E). Bekanntermaßen kann ein Fehlen der Asm die Virusaufnahme und Replikation beeinflussen ^{20,35}. *In vitro* Versuche mit Asm Inhibitoren zeigten allerdings keine Hinweise, dass Asm -inhibierte Zellen besser Masernviren aufnehmen oder replizieren ¹⁶⁶. Wie zuvor demonstriert, kann die Asm oder deren Fehlen Immunzellen und deren Funktion verändern. An Tag 7 ist der Virustiter nach Maserninfektion am höchsten, sinkt danach ab, kann aber nicht vollständig eliminiert werden ¹²⁹. Während das Masernvirus bereits nach wenigen Stunden beginnt sich zu replizieren, braucht das adaptive Immunsystem mehrere Tage für die Aktivierung und Expansion von Immunzellen ⁴⁶. An Tag 7 nach Infektion ist die Immunantwort gegen das Virus

bereits angelaufen, infizierte Tiere zeigten eine erhöhte CD8⁺ T-Zellfrequenz im Gehirn gegenüber uninfizierten Tieren (Abb. 23 A). Dies ist typisch für eine Immunantwort bei Infektion, da die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen diejenigen sind, welche virusinfizierte Zellen eliminieren. Die absolute Anzahl an CD8⁺ T-Zellen im Gehirn war in der akuten Phase in infizierten WT und Asm^{-/-} Mäusen vergleichbar (Abb. 23 B). Dementsprechend gab es keine Unterschiede zwischen den Genotypen bezüglich der Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen in das Gehirn. Allerdings war die Anzahl und die Frequenz an Masernvirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Asm^{-/-} Mäusen in der akuten Phase verringert (Abb. 25 B und C). Möglicherweise kommt es durch die Asm-Defizienz zur Apoptose von MV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen. Die fehlende Eliminierung des Masernvirus durch MV-spezifische zytotoxische T-Zellen liefert eine mögliche Ursache für die erhöhte Anzahl infizierter Neuronen in Asm^{-/-} Mäusen. Verantwortlich für die verringerte Anzahl an MV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ist möglicherweise die fehlende Migration der spezifischen CD8⁺ T-Zellen ins Hirn oder wird durch Defekte bei der Zellexpansion verursacht. Nachdem die Anzahl der MV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auch in den drainierenden, zervikalen Lymphknoten von Asm^{-/-} Mäusen verringert war (nicht gezeigte Daten), deutet dies auf eine verminderte klonale Expansion hin.

Eine weiteres Argument für die mangelhafte Virusbeseitigung durch Immunzellen in Asm^{-/-} Mäusen könnten Defekte in der Differenzierung zu Effektor-T-Zellen sein. Für eine erfolgreiche Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen müssen naive T-Zellen Antigenkontakt gehabt haben. Diese Antigenpräsentation könnte in Asm^{-/-} Mäusen defekt sein (noch nicht untersucht in der Literatur). Die Differenzierung zu Effektor-T-Zellen scheint aber grundsätzlich zu funktionieren. *In vitro* wurden Versuche zur Th1 Differenzierung unter Amitriptylinbehandlung durchgeführt, bei denen es in Gegenwart von Amitriptylin erfolgreich zu einer Th1 Differenzierung kam (nicht gezeigte Daten). In dieser Arbeit wurde nicht untersucht wurde, ob die Effektor-T-Zellen/Zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen funktionell waren und Granzym B ausschütten¹⁶⁷. Allerdings zeigt eine unpublizierte Arbeit, dass Amitriptylin die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen sowie die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen inhibierte¹⁶⁸. Hohe Konzentrationen von Amitriptylin reduzierten außerdem die Sekretion von Granzym B. Keinen Einfluss hatte Amitriptylin auf die Aktivierung der

CD8⁺ T-Zellen, sowie auf die zytotoxische Kapazität. Letzteres steht allerdings im Widerspruch zur Literatur steht (Herz et al). Die Inhibitoren der sauren Ceramidase (Ceranib-2) und der Sphingosinkinase 1/2 (SKI-II) führten sowohl zu einer verschlechterten Differenzierung zu Effektorzellen, einer verringerten Granzym B Sekretion als auch zu einer verringerten zytotoxischen Kapazität¹⁶⁸.

Die Analyse von Immunzellen an Tag 28 nach Maserninfektion ergab eine generell erhöhte Infiltration von T-Zellen ins Gehirn von Asm^{+/-} und Asm^{-/-} Mäusen. Die Anzahl von CD8⁺, CD4⁺, Treg und Tconv Zellen war gegenüber dem WT signifikant erhöht (Abb. 23C, D und Abb. 24 D, E, F, sowie nicht gezeigte Daten). Verantwortlich für die erhöhte Infiltration könnte möglicherweise die noch vorliegende, stärkere MV Infektion in Asm^{-/-} Mäusen sein. Allerdings allein das Vorliegen einer starken MV Infektion ist nicht hinreichend für eine erhöhte Immunzellinfiltration, da es an Tag 7 keine Unterschiede bei den Gesamt-CD8⁺ T-Zellen gab (Abb. 23A).

A, B) und sogar weniger MV-spezifische CD8⁺ T-Zellen in Asm^{-/-} Mäusen (Abb. 25) vorhanden waren, die wie gezeigt, mehr Infektion aufwiesen (Abb. 21 D). Trotz erhöhtem Vorliegen von CD8⁺ T-Zellen im Gehirn während der persistenten Phase (Abb. 23 C und D) kam es in Asm^{-/-} Mäusen nicht im gleichen Maß zur Beseitigung der Virusinfektion wie in WT Mäusen. Ein Grund hierfür ist, dass zwar die Gesamtanzahl der CD8⁺ T-Zellen in Asm^{-/-} Mäusen gegenüber WT Mäusen zunahm (Abb. 23 C und D), aber die Anzahl der Masernvirus-spezifischen T-Zellen nicht im gleichen Maß anstieg (Abb. 25). Verantwortlich hierfür könnte eine defekte klonale Expansion sein. Denkbar ist es auch, dass die erhöhte Anzahl von CD8⁺ T-Zellen im gleichen Maße durch die ebenfalls erhöhte Anzahl an Treg Zellen kontrolliert und diese in ihrer Funktion inhibiert werden. In der persistenten Phase zeigte sich auch, dass die Immunzellen nicht mehr proliferativ waren wie in der akuten Phase, sondern einen eher ruhenden Phänotyp hatten (Abb. 26).

Wie zuvor gezeigt, führte eine Behandlung mit Amitriptylin zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Treg und Tconv Zellen (Abb. 12, Abb. 16, Abb. 18) aufgrund der selektiven Apoptose von WT Tconv Zellen durch Amitriptylin. Auch wenn man während der Infektion keine selektive Erhöhung der Treg-Frequenz in Asm^{-/-} Mäusen sehen kann (Abb. 24 C und F), könnte die Abwesenheit der Asm auch

während der Infektion zu einem selektiven Absterben von Effektor-T-Zellen führen. Mittels Recall-Assay sollte überprüft werden, ob es Masernvirus-spezifische CD4⁺ Effektor-T-Zellen an Tag 7 nach Infektion in der Peripherie gibt. Dazu wurden CD4⁺ T-Zellen beziehungsweise nur Tconv Zellen mit Masernantigen stimuliert und die Proliferation, sowie die Zytokinproduktion, analysiert (nicht gezeigte Daten). Masernantigen-stimulierte Zellen zeigten keine Proliferation und Zytokinausschüttung. Das kann zum einen darauf beruhen, dass es keine Masern-spezifischen Zellen gab, was eher unwahrscheinlich ist, oder dass die antigenspezifische Stimulation an sich nicht funktioniert hat. Denkbar wären Probleme bei der Antigenaufreinigung. Die Zellen waren intakt, da die CD3 Kontrollstimulation eine Proliferation induzierte. Interessant wäre es gewesen, zu untersuchen, ob die Anwesenheit von Treg Zellen im Gesamt-CD4 T-Zellansatz einen Unterschied gemacht hätte. Wenn beispielsweise die stärker suppressiven Treg Zellen bereits in der Peripherie die Differenzierung und/oder Expansion von MV-spezifischen Effektor-T-Zellen unterbindet und diese weniger ins Gehirn migrieren, wäre das eine Erklärung für die verringerte Anzahl an Masernvirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen während der Akutphase nach Infektion. Alternativ könnte ein selektives Absterben von Effektor-T-Zellen in Asm^{-/-} Mäusen für die verringerte Anzahl an Masernvirus-spezifischer T-Zellen verantwortlich sein. Ein Hinweis darauf gibt es in der Literatur, als der Zusammenhang von Asm und Glukokortikoid-induziertem Zelltod untersucht wurde. In Abwesenheit der Asm sind Gedächtnis-CD4⁺-T-Zellen nicht mehr vor Glukokortikoid-induziertem Zelltod geschützt und sterben ab⁵⁷. Verantwortlich hierfür ist, dass die Antigen-spezifischen Asm-defizienten Gedächtniszellen nur noch geringe Mengen an IL-2 sekretieren, welches vor dem Glukokortikoid-induziertem Zelltod schützt⁵⁷.

Eine weitere mögliche Interpretation für die unterschiedlich starke Infektion zwischen WT und Asm^{-/-} Mäusen ist, dass die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen nicht funktionell sein könnten. In einem LCMV Infektionsmodell wurde beschrieben, dass Asm^{-/-} Mäuse Defekte in der IFN γ und Granzymsekretion durch CD8⁺ T-Zellen aufweisen⁶⁰. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die sekretorische Kapazität nicht untersucht. Dennoch kann man vermuten, dass nicht nur die Anzahl der Masernvirus-

spezifischen CD8⁺ T-Zellen verringert ist (akute Phase), sondern sie auch weniger funktionell sind und dadurch eine erfolgreiche Viruseliminierung nicht möglich ist.

Nach der Analyse der infizierten WT und Asm^{-/-} Mäusen wurde untersucht, ob sich der Krankheitsverlauf in Asm^{-/-} Tieren durch Amitriptylinbehandlung in WT Mäusen imitieren lässt. In zwei unabhängigen Versuchen, sowohl nach ein beziehungsweise zwei Wochen Behandlung, zeigte sich in WT Mäusen, dass es tendenziell mehr infizierte Neuronen im Hirn von Amitriptylin-behandelten Mäusen gab als in Kochsalzlösung-behandelten Kontrolltieren. Allerdings kam es in keiner der Versuchsreihen zu einer Abnahme von Masernvirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch die Amitriptylinbehandlung.

Als nächstes wurde noch untersucht, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Treg Zellen und der verstärkten Masernvirusinfektion in Asm^{-/-} Mäusen und Amitriptylin-behandelten Mäusen gibt. Dafür wurden Treg Zellen in Foxp3-DTR Mäusen durch Diphtherietoxingabe in der persistenten Phase ab Tag 14 nach Infektion erfolgreich depletiert. In Anwesenheit von Treg Zellen kam es durch Amitriptylinbehandlung zu einer erhöhten Infektionsrate. In Abwesenheit von Treg Zellen in DT-behandelten Foxp3-DTR Mäusen gab es keinen Unterschied hinsichtlich der Infektionsrate unter Amitriptylinbehandlung (Abb. 28 C). Dies deutet daraufhin, dass Treg Zellen vorhanden sein müssen und dass möglicherweise Amitriptylin auf die Treg Zellen wirkt, welche dann den Verlauf der Virusinfektion beeinflussen.

Beispielsweise wäre es denkbar, dass die Amitriptylinbehandlung und die damit verbundene Hemmung der Asm zu einer verstärkten Suppressionsfähigkeit der Treg Zellen führt. Diese könnten dann die Effektor-T-Zellen, wie die Masernvirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, stärker inhibieren. Die Granzym B Sekretion oder die IFN γ Ausschüttung könnte beispielsweise durch die Amitriptylinbehandlung unterdrückt sein. Eine genaue Begründung für den Anstieg der infizierten Neuronen unter Amitriptylinbehandlung in Anwesenheit von Treg Zellen konnten wir bisher nicht finden.

In Abwesenheit von Treg Zellen in Foxp3-DTR Mäusen zeigten Kontroll-behandelte Mäuse mehr MV-spezifische CD8⁺ T-Zellen als Kontroll-behandelte WT Mäuse (Abb. 28 F). Der Unterschied war jedoch nur gering und knapp statistisch signifikant, sodass in Frage steht, ob der Unterschied hinsichtlich der MV-spezifischen CD8 T-Zellen auch einen biologischen Unterschied macht. Eigentlich wäre zu erwarten gewesen, dass in Abwesenheit der Treg Zellen die Viruselimination verbessert ist, da dann die Treg Zellen nicht die Effektor-T-Zellen supprimieren können. Zuvor konnte dies auch in der Literatur gezeigt werden. Nach Depletion der Treg Zellen in einem DEREK Modell, wiesen diese Mäuse weniger infizierte Neuronen auf ¹¹². In diesem Modell war auch die Frequenz und Anzahl der Masernvirusspezifischen CD8⁺ T-Zellen erhöht nach Depletion der Treg Zellen. Bei beiden Mauslinien können mittels Diphtherie Toxin die Treg Zellen depletiert werden, allerdings gibt es Unterschiede zwischen den Linien. Im DEREK Modell wurden die Treg bereits ab Tag 17 depletiert, im Foxp3-DTR Modell erst ab Tag 21, um eine lymphoproliferative Erkrankung zu vermeiden, welche Foxp3-DTR Mäuse 10 Tage nach Depletion entwickeln ¹³⁵. Die beiden Modelle variieren auch durch die unterschiedliche Generierung der Linien. DEREK Mäuse wurden durch transgene Expression eines sogenannten BAC Konstrukt (bacterial artificial chromosome) generiert ¹⁶⁹. Foxp3-DTR Mäuse wurden durch Einfügen eines Vektors stromabwärts des Foxp3 Stopp Codons generiert, welcher eine internal ribosome entry site (IRES), sowie Diphtherietoxin-Rezeptor und GFP Sequenz enthält ¹³⁵. Der wichtigste Unterschied ist, dass adulte Foxp3-DTR Mäuse bei langfristiger Abwesenheit der Treg Zellen Autoimmunerkrankungen entwickeln, DEREK Mäuse dagegen nicht ¹⁵⁰. Des Weiteren unterscheiden sich beide Mauslinien durch den Hintergrund, DEREK Mäuse sind C57BL/6.N Mäuse, die Foxp3-DTR Mäuse sind C57BL/6.J Mäuse. Ein direkter Vergleich beider Linien in An- und Abwesenheit von Treg Zellen während der Masernvirusinfektion wäre daher interessant und würde möglicherweise Hinweise liefern, wie Masernviren erfolgreich eliminiert werden können.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die saure Sphingomyelinase eine wichtige Funktion in T-Zellen erfüllt. Die Abwesenheit der Asm moduliert sowohl die Zusammensetzung des Immunzellkompartiments als Ganzes, indem das relative Verhältnis von Treg zu Tconv Zellen verändert wurde,

aber auch Treg Zellen auf Einzelzellebene, indem sowohl die Suppressivität als auch die CTLA-4 Umsatzrate beeinflusst wurde. Die Asm beeinträchtigte auch Treg-abhängig die Eliminierung von Masernviren. Allerdings müssen die genauen Mechanismen für die verringerte Anzahl von Masernvirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und deren Funktion noch tiefergehend untersucht werden. Inwiefern die Verschiebung des Treg zu Tconv Verhältnisses durch Amitriptylinbehandlung therapeutisch zur Behandlung von Erkrankungen im Menschen genutzt werden kann, muss noch weiter evaluiert werden. Ein weitergehender Schritt in diese Richtung wären Studien mit Depressionspatienten, deren Blut vor und nach Behandlung mit trizyklischen Inhibitoren auf Treg Zellen hin untersucht werden.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Phospholipidmetabolismus	13
Abb. 2	Translokation der Asm aus Lysosomen an die Plasmamembran und Asm-induzierte Bildung von Ceramidplattformen.	14
Abb. 3	Mechanistische Funktionsweise von Asm Inhibitoren	16
Abb. 4	Treg-vermittelte Suppressionsmechanismen.....	23
Abb. 5	Aufbau des rekombinanten Masernvirus und Infektionsmodell.....	27
Abb. 6	Erhöhung der Asm Aktivität in regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu konventionellen T-Zellen.	50
Abb. 7	Erhöhter Ceramidgehalt in Treg Zellen im Vergleich zu Tconv Zellen nach Lipidanalyse im Massenspektroskop.....	52
Abb. 8	Erhöhter Einbau von clickbarem Ceramid in Treg Zellen im Vergleich zu Tconv Zellen.	54
Abb. 9	Erniedrigte Lipidordnung in Treg Zellen und Effektor-Tconv Zellen.	55
Abb. 10	Verstärkte Suppression von Indikator T-Zellen durch Asm ^{-/-} Treg Zellen im Vergleich zu WT Treg Zellen.	57
Abb. 11	Verstärkter Transport von CLTA-4 Molekülen an die Oberfläche in Asm ^{-/-} Treg Zellen im Vergleich zu WT Zellen.	59
Abb. 12	Erhöhte Frequenz von Foxp3 ⁺ Treg Zellen in Asm ^{-/-} Mäusen.	60
Abb. 13	Verstärkte Aktivierung der Asm ^{-/-} Foxp3 ⁺ Treg Zellen.....	61
Abb. 14	Verminderte Asm Aktivität in WT Zellen, aber nicht in Asm ^{-/-} Zellen, durch trizyklische Asm Inhibitoren.....	62
Abb. 15	Nachweis von Amitriptylin und dessen Metabolit Nortriptylin im Blutserum von Amitriptylin-behandelten Mäusen, aber nicht in Kontroll-behandelten Mäusen...	63
Abb. 16	Erhöhung der Treg-Frequenzen innerhalb der CD4 ⁺ T-Zellen nach <i>in vivo</i> Behandlung von C57BL/6 WT Mäusen mit dem Asm Inhibitor Amitriptylin.	64
Abb. 17	Selektive Beeinflussung der WT T-Zellen durch Amitriptylinbehandlung, ohne Beeinflussung der endogenen Asm ^{-/-} T-Zellen.....	65
Abb. 18	Anstieg der Treg-Frequenz nach pharmakologischer <i>in vitro</i> Behandlung mit dem Asm Inhibitor Desipramin nur in Gegenwart von IL-2.	67
Abb. 19	Spezifische Wirkung des Asm Inhibitor Desipramin nach <i>in vitro</i> Gabe.....	68
Abb. 20	Erhöhte Apoptose in Zellen nach Gabe hoher Desipraminkonzentrationen.	69

Abb. 21 Schlechte MV Infektionskontrolle in $Asm^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen.....	70
Abb. 22 Repräsentative Dot Plots und Gatingstrategie zur Analyse von Immunzellen nach Maserninfektion (28 dpi).....	72
Abb. 23 Analyse der T-Zellfrequenzen und absoluten T-Zellzahlen von $CD8^{+}$ T-Zellen während der akuten und persistenten Phase der Infektion.	74
Abb. 24 Analyse der Frequenzen und absoluten T-Zellzahlen von $CD4^{+}$ T-Zellen und Treg Zellen während der akuten und persistenten Phase der Infektion.	75
Abb. 25 $Asm^{-/-}$ Mäusen wiesen eine verringerte Anzahl Masern-spezifischer $CD8^{+}$ T-Zellen auf.....	76
Abb. 26 Aktivierungszustand von T-Zellen im Gehirn während der MV-Infektion.	78
Abb. 27 Verstärkte Maserninfektion während der persistenten Phase durch Amitriptylinbehandlung von MV-infizierten WT Tieren im Vergleich zu Kontroll-behandelten Tieren.	79
Abb. 28 Verstärkte Maserninfektion in Abhängigkeit von Treg Zellen und Amitriptylinbehandlung.....	81
Abb. 29 Schematische Darstellung der Eigenschaften von Treg und Tconv Zellen aus WT und $Asm^{-/-}$ Mäusen.....	86
Abb. 30 Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Amitriptylin auf Treg und Tconv Zellen	88

7. Literaturverzeichnis

1. Airola, M. V & Hannun, Y. A. Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. *Handb. Exp. Pharmacol.* 57–76 (2013). doi:10.1007/978-3-7091-1368-4_3
2. Bienias, K., Fiedorowicz, A., Sadowska, A., Prokopiuk, S. & Car, H. Regulation of sphingomyelin metabolism. *Pharmacological Reports* **68**, 570–581 (2016).
3. Barenholz, Y. & Thompson, T. E. Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **604**, 129–158 (1980).
4. Bartke, N. & Hannun, Y. A. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S91-6 (2009).
5. Lannert, H., Gorgas, K., Meissner, I., Wieland, F. T. & Jeckel, D. Functional organization of the Golgi apparatus in glycosphingolipid biosynthesis. Lactosylceramide and subsequent glycosphingolipids are formed in the lumen of the late Golgi. *J. Biol. Chem.* **273**, 2939–46 (1998).
6. Jeckel, D., Karrenbauer, A., Birk, R., Schmidt, R. R. & Wieland, F. Sphingomyelin is synthesized in the cis Golgi. *FEBS Lett.* **261**, 155–7 (1990).
7. van Blitterswijk, W. J., van der Luit, A. H., Veldman, R. J., Verheij, M. & Borst, J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem. J.* **369**, 199–211 (2003).
8. Romero-Guevara, R., Cencetti, F., Donati, C. & Bruni, P. Sphingosine 1-phosphate signaling pathway in inner ear biology. New therapeutic strategies for hearing loss? *Front. Aging Neurosci.* **7**, 60 (2015).
9. Quintern, L. E. *et al.* Isolation of cDNA clones encoding human acid sphingomyelinase: occurrence of alternatively processed transcripts. *EMBO J.* **8**, 2469–73 (1989).
10. Grassme, H. *et al.* CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **276**, 20589–96 (2001).
11. Perrotta, C. *et al.* Syntaxin 4 is required for acid sphingomyelinase activity and apoptotic function. *J. Biol. Chem.* **285**, 40240–51 (2010).
12. Lopes Pinheiro, M. A. *et al.* Acid Sphingomyelinase-Derived Ceramide Regulates ICAM-1 Function during T Cell Transmigration across Brain Endothelial Cells. *J. Immunol.* **196**, 72–9 (2016).
13. Gulbins, E. Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacol. Res.* **47**, 393–399 (2003).
14. Beckmann, N., Sharma, D., Gulbins, E., Becker, K. A. & Edelmann, B. Inhibition of acid sphingomyelinase by tricyclic antidepressants and analogs. *Front. Physiol.* **5**, 331 (2014).
15. Schissel, S. L., Keesler, G. A., Schuchman, E. H., Williams, K. J. & Tabas, I. The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene. *J. Biol. Chem.* **273**, 18250–9 (1998).
16. Kornhuber, J., Rhein, C., Müller, C. P. & Mühle, C. Secretory sphingomyelinase in health and disease. *Biol. Chem.* **396**, 707–36 (2015).
17. Wiegmann, K., Schütze, S., Machleidt, T., Witte, D. & Krönke, M. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* **78**, 1005–1015 (1994).
18. Brenner, B. *et al.* Fas/CD95/Apo-I activates the acidic sphingomyelinase via Caspases. *Cell Death Differ.* **5**, 29–37 (1998).
19. Cifone, M. G. *et al.* Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an

- acidic sphingomyelinase. *J. Exp. Med.* **180**, 1547–52 (1994).
20. Avota, E., Gulbins, E. & Schneider-Schaulies, S. DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells. *PLoS Pathog.* **7**, e1001290 (2011).
 21. Church, L. D. *et al.* TNFR1-induced sphingomyelinase activation modulates TCR signaling by impairing store-operated Ca²⁺ influx. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 266–78 (2005).
 22. Boucher, L. M. *et al.* CD28 signals through acidic sphingomyelinase. *J. Exp. Med.* **181**, 2059–68 (1995).
 23. Mueller, N., Avota, E., Collenburg, L., Grassmé, H. & Schneider-Schaulies, S. Neutral sphingomyelinase in physiological and measles virus induced T cell suppression. *PLoS Pathog.* **10**, e1004574 (2014).
 24. Tonnetti, L., Verí, M. C., Bonvini, E. & D'Adamio, L. A role for neutral sphingomyelinase-mediated ceramide production in T cell receptor-induced apoptosis and mitogen-activated protein kinase-mediated signal transduction. *J. Exp. Med.* **189**, 1581–9 (1999).
 25. Horinouchi, K. *et al.* Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann–Pick disease. *Nat. Genet.* **10**, 288–293 (1995).
 26. Otterbach, B. & Stoffel, W. Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). *Cell* **81**, 1053–61 (1995).
 27. Schuchman, E. H. & Wasserstein, M. P. Types A and B Niemann-Pick disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **29**, 237–247 (2015).
 28. Gulbins, E. *et al.* Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs. *Nat. Med.* **19**, 934–8 (2013).
 29. Kölzer, M., Werth, N. & Sandhoff, K. Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine. *FEBS Lett.* **559**, 96–8 (2004).
 30. Kornhuber, J., Retz, W. & Riederer, P. Slow accumulation of psychotropic substances in the human brain. Relationship to therapeutic latency of neuroleptic and antidepressant drugs? *J. Neural Transm. Suppl.* **46**, 315–23 (1995).
 31. Kornhuber, J. *et al.* Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMA): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell. Physiol. Biochem.* **26**, 9–20 (2010).
 32. Kolesnick, R. N., Gofñi, F. M. & Alonso, A. Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J. Cell. Physiol.* **184**, 285–300 (2000).
 33. Megha & London, E. Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *J. Biol. Chem.* **279**, 9997–10004 (2004).
 34. Bollinger, C. R., Teichgräber, V. & Gulbins, E. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1746**, 284–294 (2005).
 35. Finnegan, C. M. *et al.* Sphingomyelinase restricts the lateral diffusion of CD4 and inhibits human immunodeficiency virus fusion. *J. Virol.* **81**, 5294–304 (2007).
 36. Finnegan, C. M. *et al.* Ceramide, a target for antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15452–7 (2004).
 37. Becker, K. A., Gellhaus, A., Winterhager, E. & Gulbins, E. Ceramide-enriched

- membrane domains in infectious biology and development. *Subcell. Biochem.* **49**, 523–38 (2008).
38. Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 139–150 (2008).
 39. Okazaki, T., Bell, R. M. & Hannun, Y. A. Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **264**, 19076–80 (1989).
 40. Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L. A. & Hannun, Y. A. Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769–71 (1993).
 41. Lepple-Wienhues, A. *et al.* Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 13795–800 (1999).
 42. Hannun, Y. A. & Luberto, C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* **10**, 73–80 (2000).
 43. Hetz, C. A. *et al.* Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. *J. Cell Sci.* **115**, 4671–83 (2002).
 44. Venable, M. E., Lee, J. Y., Smyth, M. J., Bielawska, A. & Obeid, L. M. Role of ceramide in cellular senescence. *J. Biol. Chem.* **270**, 30701–8 (1995).
 45. Grassmé, H., Cremesti, A., Kolesnick, R. & Gulbins, E. Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* **22**, 5457–5470 (2003).
 46. Abbas, A., Lichtman, A. & Pillai, S. *Cellular and molecular immunology. 6Th Ed Philadelphia*, (2007).
 47. Smith, E. R., Merrill Jr., A. H. & Obeid, L. M. in *Methods in Enzymology* **312**, 361–373 (2000).
 48. Spiegel, S. & Milstien, S. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J. Biol. Chem.* **277**, 25851–4 (2002).
 49. Spiegel, S. & Milstien, S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 403–15 (2011).
 50. Matloubian, M. *et al.* Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355–360 (2004).
 51. Liu, G. *et al.* The receptor S1P1 overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR. *Nat. Immunol.* **10**, 769–77 (2009).
 52. Liu, G., Yang, K., Burns, S., Shrestha, S. & Chi, H. The S1P(1)-mTOR axis directs the reciprocal differentiation of T(H)1 and T(reg) cells. *Nat. Immunol.* **11**, 1047–56 (2010).
 53. Gassert, E. *et al.* Induction of membrane ceramides: a novel strategy to interfere with T lymphocyte cytoskeletal reorganisation in viral immunosuppression. *PLoS Pathog.* **5**, e1000623 (2009).
 54. Menne, C. *et al.* T-Cell Receptor Downregulation by Ceramide-Induced Caspase Activation and Cleavage of the zeta Chain. *Scand. J. Immunol.* **53**, 176–183 (2001).
 55. Kaga, S., Ragg, S., Rogers, K. A. & Ochi, A. Activation of p21-CDC42/Rac-activated kinases by CD28 signaling: p21-activated kinase (PAK) and MEK kinase 1 (MEKK1) may mediate the interplay between CD3 and CD28 signals. *J. Immunol.* **160**, 4182–9 (1998).
 56. Bai, A., Kokkotou, E., Zheng, Y. & Robson, S. C. Role of acid sphingomyelinase bioactivity in human CD4+ T-cell activation and immune responses. *Cell Death Dis.* **6**, e1828 (2015).

57. Tischner, D. *et al.* Acid Sphingomyelinase Is Required for Protection of Effector Memory T Cells against Glucocorticoid-Induced Cell Death. *J. Immunol.* **187**, 4509–4516 (2011).
58. Bai, A. *et al.* CD39 and CD161 modulate Th17 responses in Crohn's disease. *J. Immunol.* **193**, 3366–77 (2014).
59. Miguel, L. *et al.* Primary Human CD4⁺ T Cells Have Diverse Levels of Membrane Lipid Order That Correlate with Their Function. *J. Immunol.* **186**, 3505–3516 (2011).
60. Herz, J. *et al.* Acid sphingomyelinase is a key regulator of cytotoxic granule secretion by primary T lymphocytes. *Nat. Immunol.* **10**, 761–768 (2009).
61. Stoffel, B., Bauer, P., Nix, M., Deres, K. & Stoffel, W. Ceramide-independent CD28 and TCR signaling but reduced IL-2 secretion in T cells of acid sphingomyelinase-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* **28**, 874–80 (1998).
62. Abboushi, N. *et al.* Ceramide inhibits IL-2 production by preventing protein kinase C-dependent NF-kappaB activation: possible role in protein kinase Ctheta regulation. *J. Immunol.* **173**, 3193–200 (2004).
63. de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H. & Scheffold, A. Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2480–2488 (2004).
64. Scheffold, A., Hühn, J. & Höfer, T. Regulation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1336–1341 (2005).
65. Chinen, T. *et al.* An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat. Immunol.* 1–14 (2016). doi:10.1038/ni.3540
66. Levine, A. G., Arvey, A., Jin, W. & Rudensky, A. Y. Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nat. Immunol.* **15**, 1070–8 (2014).
67. Gogishvili, T. *et al.* Cell-intrinsic and -extrinsic control of Treg-cell homeostasis and function revealed by induced CD28 deletion. *Eur. J. Immunol.* **43**, 188–193 (2013).
68. Zhang, R. *et al.* An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs. *J. Clin. Invest.* **123**, 580–93 (2013).
69. D'Cruz, L. M. & Klein, L. Development and function of agonist-induced CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat. Immunol.* **6**, 1152–1159 (2005).
70. Boyman, O. & Sprent, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 180 (2012).
71. Gobin, V., Van Steendam, K., Denys, D. & Deforce, D. Selective serotonin reuptake inhibitors as a novel class of immunosuppressants. *Int. Immunopharmacol.* **20**, 148–156 (2014).
72. Zhang, Y. *et al.* Antidepressant drug, desipramine, alleviates allergic rhinitis by regulating Treg and Th17 cells. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **26**, 107–15 (2013).
73. McDonald, G. *et al.* Normalizing glycosphingolipids restores function in CD4⁺ T cells from lupus patients. **124**, (2014).
74. Jury, E. C. *et al.* Abnormal CTLA-4 function in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* **40**, 569–78 (2010).
75. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**, 1151–64 (1995).
76. Bala, K. K. & Moudgil, K. D. Induction and maintenance of self tolerance: the

- role of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **54**, 307–321 (2006).
77. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330–6 (2003).
 78. Kasprowicz, D. J., Smallwood, P. S., Tyznik, A. J. & Ziegler, S. F. Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4+ T cell effector function. *J. Immunol.* **171**, 1216–23 (2003).
 79. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057–61 (2003).
 80. Wildin, R. S. *et al.* X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* **27**, 18–20 (2001).
 81. Ochs, H. D. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **27**, 20–21 (2001).
 82. Hill, J. A. *et al.* Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* **27**, 786–800 (2007).
 83. Zheng, Y. *et al.* Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* **445**, 936–40 (2007).
 84. Marson, A. *et al.* Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* **445**, 931–5 (2007).
 85. Bettelli, E., Dastrange, M. & Oukka, M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5138–43 (2005).
 86. Ono, M. *et al.* Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* **446**, 685–9 (2007).
 87. Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**, 1875–86 (2003).
 88. Jonuleit, H., Schmitt, E. & Alerts, E. The Regulatory T Cell Family: Distinct Subsets and their. (2012).
 89. Pardoll, D. & Carrera, A. Thymic selection. *Curr. Opin. Immunol.* **4**, 162–5 (1992).
 90. Hsieh, C.-S., Lee, H.-M. & Lio, C.-W. J. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 157–67 (2012).
 91. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–64 (2012).
 92. Mailloux, A. W. & Young, M. R. I. Regulatory T-cell trafficking: from thymic development to tumor-induced immune suppression. *Crit. Rev. Immunol.* **30**, 435–47 (2010).
 93. Barron, L. *et al.* Cutting edge: mechanisms of IL-2-dependent maintenance of functional regulatory T cells. *J. Immunol.* **185**, 6426–30 (2010).
 94. Maloy, K. J. & Powrie, F. Fueling regulation: IL-2 keeps CD4+ Treg cells fit. *Nat. Immunol.* **6**, 1071–1072 (2005).
 95. Zhang, R., Borges, C. M., Fan, M. Y., Harris, J. E. & Turka, L. A. Requirement for CD28 in Effector Regulatory T Cell Differentiation, CCR6 Induction, and Skin Homing. *J. Immunol.* **195**, 4154–61 (2015).

96. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227–42 (2013).
97. Grazia Roncarolo, M. *et al.* Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* **212**, 28–50 (2006).
98. Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P. & Yamaguchi, T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int. Immunol.* **21**, 1105–1111 (2009).
99. Schmidt, A., Oberle, N. & Krammer, P. H. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front. Immunol.* **3**, 51 (2012).
100. Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 523–32 (2008).
101. Rabinovich, G. A. & Toscano, M. A. Turning ‘sweet’ on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 338–52 (2009).
102. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol.* **8**, 1353–62 (2007).
103. Schmidt, A., Oberle, N. & Krammer, P. H. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front. Immunol.* **3**, 51 (2012).
104. Geem, D., Harusato, A., Flannigan, K. & Denning, T. L. Harnessing regulatory T cells for the treatment of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 1409–18 (2015).
105. Lutz, M. B. & Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **23**, 445–9 (2002).
106. von Boehmer, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* **6**, 338–44 (2005).
107. Qureshi, O. S. *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* **332**, 600–3 (2011).
108. Hou, T. Z. *et al.* A Transendocytosis Model of CTLA-4 Function Predicts Its Suppressive Behavior on Regulatory T Cells. *J. Immunol.* (2015). doi:10.4049/jimmunol.1401876
109. Walker, L. S. K. & Sansom, D. M. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 852–63 (2011).
110. Qureshi, O. S. *et al.* Constitutive clathrin-mediated endocytosis of CTLA-4 persists during T cell activation. *J. Biol. Chem.* **287**, 9429–40 (2012).
111. Abdel Shakor, A. B., Atia, M. M., Kwiatkowska, K. & Sobota, A. Cell surface ceramide controls translocation of transferrin receptor to clathrin-coated pits. *Cell. Signal.* **24**, 677–684 (2012).
112. Reuter, D., Sparwasser, T., Hünig, T. & Schneider-Schaulies, J. Foxp3⁺ Regulatory T Cells Control Persistence of Viral CNS Infection. *PLoS One* **7**, e33989 (2012).
113. Longhi, S. Nucleocapsid structure and function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **329**, 103–28 (2009).
114. Horikami, S. M. & Moyer, S. A. Structure, transcription, and replication of measles virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **191**, 35–50 (1995).
115. Yanagi, Y., Tatsuo, H., Ono, N. & Tanaka, K. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**, 893–897 (2000).
116. Yanagi, Y., Takeda, M. & Ohno, S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J. Gen. Virol.* **87**, 2767–2779 (2006).

117. de Vries, R. D. *et al.* In vivo tropism of attenuated and pathogenic measles virus expressing green fluorescent protein in macaques. *J. Virol.* **84**, 4714–24 (2010).
118. Andres, O. CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *J. Gen. Virol.* **84**, 1189–1197 (2003).
119. Leonard, V. H. J. *et al.* Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J. Clin. Invest.* **118**, 2448–58 (2008).
120. WHO. WHO | Measles. WHO (2017). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/>. (Accessed: 7th May 2017)
121. Patel, M. K. *et al.* Progress Toward Regional Measles Elimination — Worldwide, 2000–2015. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 1228–1233 (2016).
122. de Swart, R. L. *et al.* Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog.* **3**, e178 (2007).
123. de Witte, L. *et al.* DC-SIGN and CD150 have distinct roles in transmission of measles virus from dendritic cells to T-lymphocytes. *PLoS Pathog.* **4**, e1000049 (2008).
124. Esolen, L. M., Ward, B. J., Moench, T. R. & Griffin, D. E. Infection of monocytes during measles. *J. Infect. Dis.* **168**, 47–52 (1993).
125. Schneider-Schaulies, S., Kreth, H. W., Hofmann, G., Billeter, M. & Ter Meulen, V. Expression of measles virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with measles, SSPE, and autoimmune diseases. *Virology* **182**, 703–11 (1991).
126. Kirk, J., Zhou, A. L., McQuaid, S., Cosby, S. L. & Allen, I. V. Cerebral endothelial cell infection by measles virus in subacute sclerosing panencephalitis: ultrastructural and in situ hybridization evidence. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **17**, 289–97 (1991).
127. McQuaid, S., Kirk, J., Zhou, A. L. & Allen, I. V. Measles virus infection of cells in perivascular infiltrates in the brain in subacute sclerosing panencephalitis: confirmation by non-radioactive in situ hybridization, immunocytochemistry and electron microscopy. *Acta Neuropathol.* **85**, 154–8 (1993).
128. Ludlow, M., Allen, I. & Schneider-Schaulies, J. Systemic spread of measles virus: overcoming the epithelial and endothelial barriers. *Thromb. Haemost.* **102**, 1050–6 (2009).
129. Reuter, D. & Schneider-Schaulies, J. Measles virus infection of the CNS: human disease, animal models, and approaches to therapy. *Med. Microbiol. Immunol.* **199**, 261–271 (2010).
130. Fisher, D. L., Defres, S. & Solomon, T. Measles-induced encephalitis. *QJM* **108**, 177–182 (2015).
131. Gadoth, N. Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) the story of a vanishing disease. *Brain Dev.* **34**, 705–711 (2012).
132. Liebert, U. G. & Finke, D. Measles virus infections in rodents. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **191**, 149–66 (1995).
133. Duprex, W. P. *et al.* The H gene of rodent brain-adapted measles virus confers neurovirulence to the Edmonston vaccine strain. *J. Virol.* **73**, 6916–22 (1999).
134. Schubert, S. *et al.* A mouse model of persistent brain infection with recombinant Measles virus. *J. Gen. Virol.* **87**, 2011–9 (2006).

135. Kim, J. M., Rasmussen, J. P. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* **8**, 191–7 (2007).
136. Hollmann, C. *et al.* Inhibition of Acid Sphingomyelinase Allows for Selective Targeting of CD4⁺ Conventional versus Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **197**, 3130–3141 (2016).
137. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. C entral M emory and E ffector M emory T C ell S ubsets : Function, Generation, and Maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745–763 (2004).
138. Collenburg, L. *et al.* A Functionalized Sphingolipid Analogue for Studying Redistribution during Activation in Living T Cells. *J. Immunol.* **196**, (2016).
139. Owen, D. M. *et al.* High plasma membrane lipid order imaged at the immunological synapse periphery in live T cells. *Mol. Membr. Biol.* **27**, 178–89 (2010).
140. Jin, L. *et al.* Characterization and application of a new optical probe for membrane lipid domains. *Biophys. J.* **90**, 2563–75 (2006).
141. Mitchell, D. M. & Williams, M. A. An Activation Marker Finds a Function. *Immunity* **32**, 9–11 (2010).
142. Zhang, D. *et al.* Manipulating regulatory T cells: a promising strategy to treat autoimmunity. *Immunotherapy* **7**, 1201–1211 (2015).
143. Nguyen, T.-L. M., Makhlof, N. T., Anthony, B. A., Teague, R. M. & DiPaolo, R. J. In Vitro Induced Regulatory T Cells Are Unique from Endogenous Regulatory T Cells and Effective at Suppressing Late Stages of Ongoing Autoimmunity. *PLoS One* **9**, e104698 (2014).
144. Lundsgaard, D., Holm, T. L., Hornum, L. & Markholst, H. In vivo control of diabetogenic T-cells by regulatory CD4⁺CD25⁺ T-cells expressing Foxp3. *Diabetes* **54**, 1040–7 (2005).
145. Arimochi, H. & Morita, K. Desipramine induces apoptotic cell death through nonmitochondrial and mitochondrial pathways in different types of human colon carcinoma cells. *Pharmacology* **81**, 164–72 (2008).
146. Albouz, S. *et al.* Tricyclic antidepressants induce sphingomyelinase deficiency in fibroblast and neuroblastoma cell cultures. *Biomedicine* **35**, 218–20 (1981).
147. Barthlott, T. *et al.* CD25⁺ CD4⁺ T cells compete with naive CD4⁺ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int. Immunol.* **17**, 279–88 (2005).
148. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutellingsperger, C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **184**, 39–51 (1995).
149. Veiga-Parga, T., Sehrawat, S. & Rouse, B. T. Role of regulatory T cells during virus infection. *Immunol. Rev.* **255**, 182–96 (2013).
150. Mayer, C. T. *et al.* Few Foxp3⁺ regulatory T cells are sufficient to protect adult mice from lethal autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2990–3002 (2014).
151. Kim, J. M., Rasmussen, J. P. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* **8**, 191–197 (2007).
152. Boehm, F. *et al.* Deletion of Foxp3⁺ regulatory T cells in genetically targeted mice supports development of intestinal inflammation. *BMC Gastroenterol.* **12**, 97 (2012).
153. Apostolidis, S. A. *et al.* Phosphatase PP2A is requisite for the function of

- regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **17**, 556–64 (2016).
154. Catalfamo, M., Tai, X., Karpova, T., McNally, J. & Henkart, P. A. TcR-induced regulated secretion leads to surface expression of CTLA-4 in CD4+CD25+ T cells. *Immunology* **125**, 70–9 (2008).
 155. Zhou, Y. *et al.* Acid Sphingomyelinase (ASM) is a Negative Regulator of Regulatory T Cell (Treg) Development. *Cell. Physiol. Biochem.* **39**, 985–95 (2016).
 156. Paterson, A. M. *et al.* Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity. *J. Exp. Med.* **212**, 1603–21 (2015).
 157. Mahmud, S. A., Manlove, L. S. & Farrar, M. A. Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. *JAK-STAT* **2**, e23154 (2013).
 158. Zamorano, J. *et al.* Regulation of Cell Growth by IL-2: Role of STAT5 in Protection from Apoptosis But Not in Cell Cycle Progression. *J. Immunol.* **160**, (1998).
 159. Boise, L. H. *et al.* CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* **3**, 87–98 (1995).
 160. Akbar, A. N. *et al.* Interleukin-2 receptor common γ -chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: Selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *Eur. J. Immunol.* **26**, 294–299 (1996).
 161. Elojeimy, S. *et al.* New insights on the use of desipramine as an inhibitor for acid ceramidase. *FEBS Lett.* **580**, 4751–4756 (2006).
 162. Dennstädt, F., Hollmann, C., Schneider-Schaulies, J. & Beyersdorf, N. No Title. (Würzburg, 2017).
 163. Li, Y. *et al.* Altered expression of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and its 5-HT(1a) receptor in patients with major depression disorder. *J. Affect. Disord.* **124**, 68–75 (2010).
 164. Himmerich, H. *et al.* Regulatory T cells increased while IL-1 β decreased during antidepressant therapy. *J. Psychiatr. Res.* **44**, 1052–7 (2010).
 165. Kirschnek, S. *et al.* CD95-mediated apoptosis in vivo requires acid sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 27316–23 (2000).
 166. Bach, M., Hollmann, C. & Schneider-Schaulies, J. Die Rolle des Sphingolipid-Metabolismus bei der Masernvirusinfektion lymphoider Zellen. (Würzburg, 2016).
 167. Herz, J. *et al.* Acid sphingomyelinase is a key regulator of cytotoxic granule secretion by primary T lymphocytes. *Nat. Immunol.* **10**, 761–768 (2009).
 168. Göb, S. Einfluss des Sphingolipidstoffwechsels auf die Aktivierung, Differenzierung und die Effektorfunktion von CD8+ zytotoxischen T-Zellen. (Universität Würzburg, 2014).
 169. Lahl, K. *et al.* Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J. Exp. Med.* **204**, 57–63 (2007).

8. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATV	antibiotic trypsin versene
BSA	Rinderserumalbumin
BSS	Balanced salt solution
ca.	circa
CAMH	Hämagglutinin des CAM/RB-Stammes
CD	Cluster of differentiation
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (cytotoxic T lymphocyte)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DEREG Mäuse	Depletion of regulatory T-cells Mäuse
dpi	Tage nach Infektion (days post infection)
Foxp3-DTR Mäuse	Foxp3 Diphtherietoxin-Rezeptor Mäuse
dest. (dd)	destilliert
DT	Diphtherietoxin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	forkhead box protein 3 Forkhead-Box-Protein P3
FSC	forward scatter, Vorwärtsscatter
g	Gramm / g-Kraft (Beschleunigung)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H ₂ O	Wasser
i.c.	intrazerebral (intracerebral)
i.p.	Intraperitoneal
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
IPEX linked	Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-
iTreg	Induzierte regulatorische T-Zelle
l	Liter
LN	Lymphknoten
MEM	minimum essential medium
MFI	Durchschnittliche Fluoreszenzintensität
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minuten
MOI	infektiöse Dosis (multiplicity of infection)
MV	Masern Virus
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NF- κ B	Nuclear factor κ B
ns	Nicht signifikant
nTreg	Natürliche regulatorische T-Zelle
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBBS	phosphate-buffered balanced salt solution
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SSC	side scatter
SD	Standardabweichung
Sp	Milz
Std.	Stunden
Tconv	konventionelle T-Zellen
Tc Eff	Effektor-T-Zellen
TGF β	Transforming growth factor β
Tind	Indikator T-Zellen
TNF	Tumor necrosis factor
Treg	Regulatorische T-Zelle

TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Units
UZ	Ultrazentrifuge
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

9. Danksagung

Bedanken möchte ich mich allen voran bei meinem Doktorvater Niklas Beyersdorf für die ausgezeichnete Betreuung, für die vielen hilfreichen und fruchtbaren Diskussionen und seine Unterstützung in allen Bereichen. Ebenso bedanke ich mich sehr herzlich bei meinem zweiten Betreuer Jürgen Schneider-Schaulies und bedanke mich für unsere sehr gute gemeinsame Arbeit in der Projektgruppe P02 des SphingoFOR Netzwerks. Herzlich danken möchte ich auch Alexandra Schubert-Unkmeir für ihre Unterstützung und Betreuung.

Ganz besonders Danken möchte ich Anika Grafen und Anna Uri für ihre große Hilfe bei laufenden Versuchen, ebenso danke ich besonders Isabell Schreck, Sandra Werner, Nelli Wolf, Elita Avota und Lena Collenburg für unsere gute Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle anderen Laborkollegen aus der AG Beyersdorf und AG Kerkau. Danke für eure Unterstützung, die tolle Arbeitsatmosphäre und die vielen schönen gemeinsamen Erlebnisse. Auch danke ich allen Kollegen aus AG JSS und SSS, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Tierstalls und bei Christian Linden fürs Sorting, die ebenfalls zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben. Dank gebührt auch meinen externen Partnern: der AG Kleuser, insbesondere Herrn Japtok, für die Durchführung der Massenspektroskopischen Analysen und dem TDB-Labor der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, insbesondere Herrn Burger, für die Serumanalysen. Dank auch an das SphinoFOR Netzwerk für anregende Treffen und Diskussionen und finanzielle Mittel. Ebenso bedanke ich mich beim Graduierten Kolleg Immunmodulation und bei der Graduierten Schule Würzburg für Unterstützung und Reisemittel.

Großer Dank gebührt meinem Ehemann und meiner Familie, die immer an mich glaubt haben, mir den Rücken gestärkt haben und mich in jeglicher Hinsicht während meines Studiums und meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

- 07/2014 Retreat SphingoFOR 2123 "Sphingolipid dynamics in infection control", Eibelstadt, Vortrag: "Role of acid sphingomyelinase (Asm) in CD4+ regulatory T cells controlling anti-viral immune responses"
- 06/2014 9th Network Meeting of the Graduate School of Life Sciences of the Universities Würzburg, Erlangen and Tübingen, Kloster Schöntal

Mitgliedschaften, Preise, Qualifikationen

- 02/2014 - dato Graduate School of Life Sciences (GSLs), Universität Würzburg, gefördert durch die Deutsche Exzellenzinitiative
- Jan 2015 – dato Deutsche Gesellschaft für Immunologie
- 08/2016 EFIS Travel Award, DGFI Travel Award
- 01/2015 ImmunoTools Awards 2015
- 05/2016 Posterdesign
- 07/2014 Grundkurs Tierschutz und Versuchstierkunde (FELASA)
- 06/2014 Search strategies for scientists, Endnote for scientist
- 04/2014 Wissenschaftliches Schreiben für PhD-Studenten

Schul- und Hochschulbildung

- 2/2014 - 5/2017 Julius-Maximilians Universität Würzburg
Institut für Immunologie und Virologie
Promotion (Dr. rer. nat.)
- 10/2011 - 10/2013 Julius-Maximilians Universität Würzburg
Master of Science Biologie
- Master Thesis: "Funktionelle Bedeutung der Expression von Osteopontin in CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen im Rahmen eines experimentellen Myokardinfarkts"
- 10/2008 – 08/2011 Julius-Maximilians Universität Würzburg
Bachelor of Science Biologie
- Bachelor Thesis: "Schwann cell-related macrophage activation in mice heterozygously deficient for x-chromosome-linked Cx32 (GJB1)"
- 09/1999 - 06/2008 Graf-Rasso-Gymnasium, Fürstfeldbruck, math.-naturw. Zweig
Allgemeine Hochschulreife