

Aus dem Institut für Virologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Lars Dölken

**Produktion und pathophysiologische Bedeutung von
Sphingosin-1-Phosphat in humanen dendritischen Zellen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lisa Pilgram

aus Biberach/Riss

Würzburg, Februar 2020



Referentin: Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies

Korreferentin: Prof. Dr. Alexandra Schubert-Unkmeir

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2020

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1 Das Masernvirus	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Klinik.....	2
1.1.3 Taxonomie, Morphologie und Struktur	3
1.1.4 Replikationszyklus	4
1.1.5 Dissemination und Transmission	6
1.1.6 Induzierte Immunantwort	6
1.2 Dendritische Zellen	8
1.2.1 Ontogenese, DC-Subtypen und Generierung <i>in vitro</i>	8
1.2.2 Entwicklungsstadien dendritischer Zellen.....	10
1.2.3 Rolle dendritischer Zellen bei Maserninfektion	11
1.3 Sphingosin-1-Phosphat.....	12
1.3.1 Metabolismus und Verteilung	13
1.3.2 Wirkmechanismen.....	15
1.3.3 Pathogenetische Bedeutung.....	18
1.4 Bedeutung von Chemokinen für die Koordination von T-Zellen und DCs ...	19
1.5 Zielsetzung	20
2. Material.....	21
2.1 Geräte	21
2.2 Datenverarbeitungsprogramme	22
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	22
2.4 Kits	23

2.5	Reagenzien	23
2.5.1	Primer	23
2.5.2	siRNA	24
2.5.3	Antikörper.....	24
2.5.4	Fluoreszierender Farbstoff.....	25
2.5.5	Zytokine und Chemokine	25
2.5.6	Weitere Reagenzien.....	25
2.6	Puffer und Lösungen	27
2.6.1	Zellisolation und -kultivierung.....	27
2.6.2	Durchflusszytometrie.....	27
2.6.4	ASM-/NSM-Assay	28
2.6.5	Migrationsassays	29
2.6.6	Lösungen weiterer Reagenzien.....	29
2.7	Zellen und Viren.....	30
3.	Methoden.....	31
3.1	Gewinnung und Kultivierung von Zellen.....	31
3.1.1	Quantifizierung vitaler Zellen	31
3.1.2	Kultivierung von Suspensionszelllinien	31
3.1.3	Zellkultur adhärenter Zelllinien.....	32
3.1.4	Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Bluts.....	32
3.1.5	Isolierung humaner Monozyten.....	32
3.1.5.1	Negative Selektion über magnetische Antikörper	32
3.1.5.2	Isolation über Plastikadhärenz.....	33
3.1.6	Generierung und Kultur dendritischer Zellen aus Monozyten <i>in vitro</i>	33
3.1.7	Ausreifung dendritischer Zellen	35
3.1.8	Anreicherung und Kultur primärer T-Zellen	35

3.2	Virologische Methoden	37
3.2.1	Herstellung von Virusstocks.....	37
3.2.2	Bestimmung des Virustiters	37
3.2.3	Infektion humaner dendritischer Zellen	38
3.3	RNA-Analytik	39
3.3.1	Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion	39
3.3.1.1	Isolierung von RNA für die cDNA-Synthese.....	39
3.3.1.2	Herstellung von cDNA	40
3.3.1.3	Semiquantitative Bestimmung der cDNA mittels PCR.....	41
3.3.1.4	DNA-Auftrennung mittels Gelelektrophorese und Densitometrie.....	41
3.3.2	siRNA-Transfektion	43
3.4	Durchflusszytometrie.....	43
3.4.1	Identifizierung von T-Zellen und dendritischen Zellen.....	44
3.4.2	Bestimmung zellulärer Oberflächenmoleküle	45
3.4.3	Bestimmung der Infektionsrate	46
3.4.4	Zellviabilität	46
3.4.5	CFSE-Labeling von T-Zellen	47
3.4.6	Quantitative Messung der migrierten T-Zellen mittels Counterbeads	47
3.5	Intrazelluläre Sphingolipidanalyse	49
3.6	Messung der Sphingomyelinase-Aktivität	50
3.7	Untersuchungen zur T-Zellchemotaxis	51
3.7.1	Transwell-Assay	51
3.7.2	Chemotaxis-Assay im zweidimensionalen System	52
3.8	Statistik	53
4.	Ergebnisse.....	54
4.1	Quantifizierung von S1P in DCs	54

4.1.1	S1P und Sphingosin in iDCs im Vergleich zu Erythrozyten.....	54
4.1.2	Einfluss verschiedener Ausreifungsprotokolle auf S1P in DCs	55
4.1.3	S1P in MV-infizierten DCs	57
4.1.4	Oberflächenexpression des S1P ₁ -Rezeptors in DCs nach Ausreifung und MV-Infektion.....	60
4.2	Sphingolipid-Metabolismus dendritischer Zellen	60
4.2.1	Sphingomyelinase-Aktivität dendritischer Zellen nach Ausreifung und MV-Infektion.....	61
4.2.2	Bestimmung von Zwischenprodukten der S1P-Synthese in DCs nach Ausreifung und MV-Infektion.....	62
4.2.3	Expression der Sphingosinkinasen und S1P-Lyase in DCs nach Ausreifung und MV-Infektion mittels semiquantitativer RT-PCR	65
4.3	Beitrag des S1Ps in DCs zur T-Zellchemotaxis	67
4.3.1	Chemoattraktives Potenzial ausgereifter DCs auf T-Zellen.....	67
4.3.1.1	Migration von Jurkat-T-Zellen in Antwort auf mDCs	67
4.3.1.2	Migration primärer T-Zellen aus verschiedenen Kulturmedien in Antwort auf mDCs	68
4.3.1.3	Vergleich des chemoattraktiven Potenzials ausgereifter DCs zur Chemoattraktion durch SDF-1 α	71
4.3.2	Einfluss von Ausreifung und MV-Infektion dendritischer Zellen auf die Migration primärer T-Zellen	74
4.3.3	Bedeutung des S1P ₁ -Rezeptors für die Migration primärer T-Zellen in Antwort auf mDCs	75
4.3.3.1	Oberflächenexpression des S1P ₁ -Rezeptors in T-Zellen nach Einsetzen in serumfreies Medium.....	75
4.3.3.2	Wirkung des S1P ₁ /S1P ₃ -Rezeptor-Inhibitors VPC 23019 auf die T-Zellviabilität.....	76

4.3.3.3	Auswirkungen des Inhibitors VPC 23019 auf die T-Zellchemotaxis in Antwort auf mDCs	77
4.3.4	Einfluss des Sphingosinkinase-Inhibitors SKI-II auf die T-Zellchemotaxis in Antwort auf mDCs	78
4.3.4.1	Wirkung des SphK-Inhibitors SKI-II auf die Zellviabilität.....	78
4.3.4.2	Einfluss des Inhibitors SKI-II auf die T-Zellchemotaxis	79
4.3.5	Bedeutung der Aktivität der SphK1 in DCs für das Migrationsverhalten primärer T-Zellen	81
4.3.6	Einfluss des SphK2-Inhibitors K145 auf die Migration primärer T-Zellen in Antwort auf mDCs	83
4.3.6.1	Wirkung des SphK2-Inhibitors K145 auf die Zellviabilität	83
4.3.6.2	Einfluss des Inhibitors K145 auf die T-Zellchemotaxis.....	84
4.3.7	Bedeutung der SphK2-Aktivität in DCs für das Migrationsverhalten primärer T-Zellen	86
5.	Diskussion	88
5.1	Vorkommen von S1P in humanen DCs.....	88
5.1.1	Einfluss einer Ausreifung auf den S1P-Status dendritischer Zellen.....	89
5.1.2	Einfluss einer MV-Infektion auf den S1P-Status dendritischer Zellen	91
5.1.3	Einfluss einer Ausreifung oder MV-Infektion auf weitere Sphingolipide .	92
5.1.4	Wirkungsort und mögliche Funktion des intrazellulär gebildeten S1Ps	94
5.2	Bedeutung des S1Ps für die T-Zellchemotaxis in Antwort auf DCs.....	95
5.2.1	mDCs-induzierte T-Zellmigration.....	96
5.2.2	Betrachtung der mDCs- im Vergleich zur SDF-1 α -induzierten T-Zellchemotaxis.....	98
5.2.3	Einfluss der DC-Ausreifung oder MV-Infektion auf ihr chemoattraktives Potenzial	99
5.2.4	Beeinflussung der Migrationsfähigkeit von T-Zellen durch die SphK	99

6.	Zusammenfassung	101
7.	Abstract.....	103
8.	Abkürzungsverzeichnis	105
9.	Abbildungs-, Formel- und Tabellenverzeichnis	111
9.1	Abbildungsverzeichnis	111
9.2	Formelverzeichnis	113
9.3	Tabellenverzeichnis	113
10.	Literaturverzeichnis	114

1. Einleitung

1.1 Das Masernvirus

1.1.1 Epidemiologie

Das Masernvirus (MV) ist ein hochkontagiöses Virus, dessen einziges Reservoir der Mensch ist. Es stellt weltweit ein Gesundheitsrisiko dar. Trotz eines zur Verfügung stehenden Impfstoffes, dessen Implementierung die Sterblichkeitsraten von 2000 auf 2018 um 72 % senken konnte, zählen Maserninfektionen auch heute noch zu den häufigsten Todesursachen vor allem bei Kindern unter 5 Jahren. Dabei ist die Mehrheit der Todesfälle in Ländern mit niedrigem Einkommen und schlechter Infrastruktur zu verzeichnen (Patel et al. 2019). 2012 formulierte die WHO das Ziel, eine Masernelimination in 5 der 6 WHO-Regionen bis 2020 zu erreichen. 2018 stieg die Maserninzidenz jedoch auf das höchste Niveau seit 2011. Die Masern-assoziierte Mortalität nahm zu, alleine in der europäischen Region verloren 4 Länder ihren Eliminationsstatus und die Ukraine zählte zu den 5 Ländern mit der höchsten Inzidenz weltweit (Zimmerman et al. 2019). Im Mai 2019 stuft die WHO die Situation daher als regionalen Notfall ein (WHO/EURO 2019). Auch in Deutschland kommt es in unregelmäßigen Abständen zu Masernausbrüchen, eine für den Kollektivschutz notwendige Durchimpfungsrate von 95 % konnte bisher nicht erzielt werden. Bei stagnierender Impfquote und anhaltend endemischem Status wurde im November 2019 vom Bundestag das Masernschutzgesetz mit Impfpflicht nach STIKO-Empfehlungen beschlossen (Die Bundesregierung der Bundesrepublik Deutschland 2019). Für eine Reduktion von Inzidenz, Morbidität und Mortalität bis hin zur weltweiten Eradikation besteht weiterhin die Notwendigkeit eines besseren Verständnisses von Pathogenese und Transmission der Erkrankung.

1.1.2 Klinik

Eine MV-Infektion ist in nahezu 100 % klinisch manifest. Nach einer Inkubationszeit von 10 - 12 Tagen setzt das katarrhalische Prodromalstadium ein, welches mit unspezifischen Symptomen wie Fieber, Husten, Rhinitis und Konjunktivitis einhergeht. In dieser Phase sind an der bukkalen Mukosa sogenannte Koplik-Flecken erkennbar, welche ein pathognomonisches Charakteristikum der MV-Infektion darstellen (Koplik 1896). 14 Tage nach Infektion entwickelt sich ein makulopapulöses Exanthem, beginnend retroaurikulär mit Ausbreitung über den gesamten Körper. Es bleibt 6 - 10 Tage bestehen. Bereits 5 Tage vor bis 4 Tage nach Auftreten des Exanthems sind die Betroffenen kontagiös. Im Rahmen der Erkrankung kommt es zu einer Immunsuppression (siehe Abschnitt 1.1.6), die die Entstehung sekundärer Infektionen und damit verbundene Komplikationen wie Ulzerationen, Otitis media, Bronchitis und Pneumonie begünstigt. Aufgrund mangelnder Hygiene, unzureichender Ernährung und dürftiger medizinischer Versorgung sind hiervon vor allem Patientinnen und Patienten in Entwicklungsländern betroffen. Dort sind überwiegend opportunistische Infektionen für die persistierenden hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten verantwortlich. Größtenteils mündet ein unkomplizierter Verlauf in der Eliminierung des Virus mit lebenslang bestehender Immunität.

Bei besonders schweren Verläufen wird die Entwicklung sogenannter Hecht'sche Riesenzellpneumonien oder Enzephalitiden beobachtet. Es sind drei unterschiedliche MV-induzierte Enzephalitiden bekannt. Die para- bzw. postinfektiöse Enzephalitis (PIE) mit einer Häufigkeit von 1:1000 beruht auf autoimmunologischen Prozessen und verläuft in 15 % letal. Residualschäden des ZNS in Form von psychotischen Persönlichkeitsveränderungen, Epilepsie und Hemi- oder Paraplegien treten in 20 % - 40 % der Fälle auf. Überwiegend bei Immunsupprimierten kann durch die Persistenz des Virus eine subakute Einschlusskörperchen-Enzephalitis (MIBE) wenige Monate nach Infektion entstehen. Selten (1:10 000) wird nach 5 - 10 Jahren die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE) als Spätkomplikation beobachtet. Beide letzteren Verlaufsformen sind zu fast 100 % letal. (Henke-Gendo 2012; Buchanan und Bonthius 2012). Eine antivirale Therapie ist bisher nicht etabliert.

1.1.3 Taxonomie, Morphologie und Struktur

Das MV gehört zur Ordnung der Mononegavirales, deren Genome einzelsträngige, nicht-segmentierte RNAs von negativer Polarität sind. Hierzu werden vier Familien gezählt: Borna-, Rhabdo-, Filo- und Paramyxoviridae. Das MV wird in der Familie der Paramyxoviridae der Unterfamilie Paramyxovirinae zugeordnet und bildet mit vier weiteren, nicht humanpathogenen Viren die Gattung der Morbilliviren, die durch das Fehlen der Neuraminidase-Aktivität charakterisiert ist.

Das MV ist ein Partikel von 120 nm - 200 nm Größe. Dabei umhüllt eine Lipidschicht aus der Wirtsmembran einen Ribonukleoproteinkomplex, welcher sich aus viralen Strukturproteinen und viralem Genom zusammensetzt. Das virale Genom kodiert für 6 Strukturproteine (Hämagglutininprotein, Fusionsprotein, Matrixprotein, Nukleokapsidprotein, Phosphoprotein und L-Protein), und die nicht-strukturellen V- und C-Proteine.

Letztere übernehmen vor allem regulatorische Aufgaben bei Replikation und Transkription (Escoffier et al. 1999; Patterson et al. 2000; Tober et al. 1998) und spielen als Virulenzfaktoren bei der Suppression der zellulären Immunantwort eine Rolle (Palosaari et al. 2003; Shaffer et al. 2003; Pfaller et al. 2014). Die Translation beider Proteine erfolgt an derselben mRNA wie die Translation des Phosphoproteins (P). Dies wird durch Verwendung eines alternativen Leserasters (C-Protein) bzw. über mRNA-Editierung (V-Protein), also dem ko-transkriptionellen Einfügen zusätzlicher Nukleotide, ermöglicht (Bellini et al. 1985; Devaux und Cattaneo 2004).

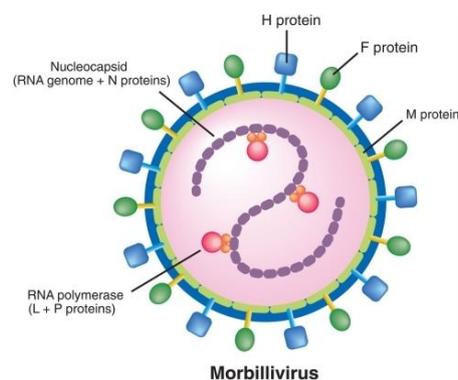


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines MV Partikels. Mit Genehmigung aus (Sato et al. 2012) unter CC BY-NC 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/legalcode.de>).

Das P-Protein ist Ko- und Regulationsfaktor der viralen Polymerase (L-Protein) (Ray und Fujinami 1987; Horikami et al. 1994). Diese beiden Proteine bilden mit dem Nukleokapsidprotein (N-Protein) und dem Genom einen stabilen Ribonukleoproteinkomplex, der über das Matrixprotein (M-Protein) in Verbindung zur Lipidhülle steht. Daneben unterstützt das M-Protein die Freisetzung viraler Partikel (Naim et al. 2000; Rota et al. 1994; Salditt et al. 2010) und hat einen hemmenden Einfluss auf die Transkription des Virus (Suryanarayana et al. 1994) und der Wirtszelle (Yu et al. 2016).

Die Glykoproteine Hämagglutinin (H-Protein) und Fusionsprotein (F-Protein) sind integrale Bestandteile der Lipidhülle. Das H-Protein liegt dabei als Tetramer vor (Sato et al. 1995) und kann an verschiedene zelluläre Rezeptoren binden (Bieback et al. 2002; Zhang et al. 2013). Das F-Protein wird zunächst als Vorläufer F₀ synthetisiert, im Golgi-Apparat proteolytisch zu F₁ und F₂ gespalten und über die F₁-Untereinheit in der Membran verankert (Sato et al. 1988). Gemeinsam bilden die beiden Glykoproteine einen funktionellen Komplex, der den Eintritt des Virus in die Wirtszelle ermöglicht. Die fusogene Aktivität ist dabei abhängig von ihrer dynamischen Interaktion und der Regulation durch das M-Protein (Wild et al. 1991; Cathomen et al. 1998; Plemper et al. 2002).

1.1.4 Replikationszyklus

Der initiale Schritt einer MV-Infektion ist die Bindung des H-Proteins an einen zellulären Rezeptor mit nachfolgender F-Protein-vermittelter Membranfusion. Als Eintrittsrezeptoren dienen drei unterschiedliche Moleküle. Komplementbindungsfaktor CD46, der auf kernhaltigen Zellen vorhanden ist, kann *in vitro* von MV-Impfstämmen, jedoch nicht von Wildtypisolaten genutzt werden (Dorig et al. 1993; Naniche et al. 1993). *In vivo* und *in vitro* ist das auf aktivierten T- und B-Zellen, Makrophagen und ausgereiften dendritischen Zellen (mDCs) exprimierte CD150 Eintrittsrezeptor für Impf- und Wildtypstämme (Tatsuo et al. 2000; Vries et al. 2010) und begründet den Lymphtropismus des MV. Mit dem auf der basolateralen Membran von Epithelzellen, Keratinozyten und Endothelzellen exprimierten Nectin-4 wurde der MV-Eintrittsrezeptor für diese nicht-hämatopoetischen Zellen identifiziert (Muhlebach et al. 2011; Noyce et al. 2011; Abdullah et al. 2013). Der virale Glykoproteinkomplex

interagiert zusätzlich mit Pattern Recognition Receptors (PRRs) auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (TLR-2 oder DC-SIGN), die darüber Aufnahme, Verbreitung und Pathogenität des MV modulieren (Bieback et al. 2002; Witte et al. 2006).

Direkt nach Freisetzung des MV ins Zytoplasma der Wirtszelle werden zunächst virale mRNAs transkribiert. Das Genom beinhaltet 6 kodierende Sequenzen, die von nicht-kodierenden intergenischen Elemente (IGS) flankiert sind, welche wiederum Termination, Polyadenylierung und Re-Initiierung der Transkripte regulieren (Bellini et al. 1994). 5'- und 3'-terminal sind weitere nicht-kodierenden Regionen (NCR) lokalisiert, die Promotor und Enkapsidierungssignale enthalten (Crowley et al. 1988; Parks et al. 2001). Nach Bindung der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase an die Promotorregion im nicht-kodierenden 3'-Abschnitt erfolgt die Transkription des ersten Gens. Bei Erreichen der Regulationssignale der darauffolgenden intergenischen Sequenz wird die gebildete mRNA über Polyadenylierung und 5'-Capping modifiziert und die Transkription am nächsten Initiationspunkt fortgeführt. Auf dieselbe Weise werden auch die nachfolgenden Gene transkribiert. Dabei kann es zur Ablösung der Polymerase kommen, was im Laufe der Transkription zur Entstehung eines Gradienten der gebildeten mRNAs führt (Cattaneo et al. 1987). Durch die Anordnung der Gensequenzen kommt es zu hohen Konzentrationen an N-Protein und zu niedrigen an L-Protein.

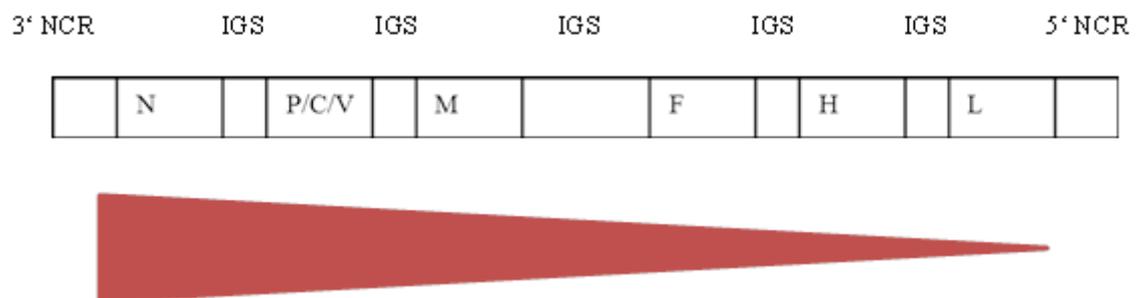


Abbildung 2: Darstellung des MV Genoms. Der rote Balken stellt das Konzentrationsgefälle der mRNA, sowie der Proteinprodukte dar. Dabei wird das N-Gen am häufigsten exprimiert, während das L-Protein am Ende des Gefälles steht.

Die Replikation des viralen Genoms erfordert die Transkription durch den Polymerasekomplex unter Überlesen der intergenischen Sequenzen mit Bildung eines vollständigen, positivsträngigen Antigenoms, das dann als Matrize für negativsträngige RNA-Genome dient (Banerjee 1987).

Nach Zusammensetzen des Ribonukleoproteinkomplexes wird dieser zur Plasmamembran transportiert, wo die Partikel durch die Interaktion von M-, F- und H-Protein umgeben von Wirtsmembran freigesetzt werden (Vincent et al. 2000).

1.1.5 Dissemination und Transmission

Die Virusaufnahme erfolgt vorwiegend über den Respirationstrakt, wobei auch alternative Routen über die Konjunktiva möglich sind (Papp 1956). Fehlende Eintrittsrezeptoren (CD150, Nectin-4) an ihrer apikalen Oberfläche machen Epithelzellen als primäre Zielzellen unwahrscheinlich, vielmehr vermittelt der Eintrittsrezeptor CD150 auf CD11c-positiven Zellen die Aufnahme in DCs oder alveolare Makrophagen (Swart et al. 2007; Lemon et al. 2011). Mit Hilfe des afferenten lymphatischen Transports gelangt das Virus in drainierende Lymphknoten und in Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe des Respirationstraktes (BALT), wo Replikation und Weitergabe des MV stattfinden (Vries et al. 2010; Mesman et al. 2012). Die systemische Dissemination des MV erfolgt im retikulohistiozytären System über Lymphe und Blut. Zielorgane sind Leber, Niere, Haut und Atemwege (McChesney et al. 1997; Ludlow et al. 2015). Bei der Infektion weiterer Zellen sind sowohl CD150, als auch Nectin-4 von Bedeutung (Frenzke et al. 2013; Ludlow et al. 2015).

Der horizontalen Transmission des MV liegt die Infektion respiratorischer Epithelzellen zugrunde. Basolateral werden über Nectin-4 virale Partikel aufgenommen und apikal in den Mukus des Respirationstraktes abgegeben (Ludlow et al. 2013). Durch die Partikelabscheidung und Aerosolbildung kann die Übertragung des Virus auf weitere Personen erfolgen (Jong und Winkler 1964; Bloch et al. 1985).

1.1.6 Induzierte Immunantwort

Eine MV-Infektion führt über komplexe Immunsysteminteraktionen neben der Ausbildung einer starken spezifischen Immunantwort mit Viruselimination und

folgender lebenslanger Immunität auch zur prolongierten Immunsuppression, die durch opportunistische Infektionen entscheidend zur hohen Morbidität und Mortalität der Erkrankung beiträgt (Griffin 1995; Mina et al. 2015).

Die Virulenzfaktoren C- und V-Protein des Masernvirus verhindern initial eine unspezifische Immunantwort, sodass es nicht zur Interferon-abhängigen Hemmung viraler Replikation kommt. Es entsteht eine Latenzphase mit ausgeprägter Dissemination des Virus. Verschiedene proinflammatorische Zyto- und Chemokine wie IL-6, IL-1 β oder IL-18 sind nachweisbar (Griffin 2016). Für eine erfolgreiche Viruselimination ist die zelluläre Immunantwort wesentlich (Burnet 1968). Klinisch zeigt sich mit deren Einsetzen das T-Zell-abhängige typische Masernexanthem. In diesem Stadium sind im Plasma erhöhte Werte an löslichem CD4 und CD8, sowie an IL-2-Rezeptor und β 2-Mikroglobulin detektierbar (Griffin et al. 1989).

Im späteren Verlauf, nach Abklingen des Exanthems, ist vermehrt IL-4, IL-10 und IL-13, zuvor insbesondere IFN- γ und IL-2 nachweisbar (Griffin et al. 1990; Griffin und Ward 1993; Moss et al. 2002). Das Zytokinprofil in Verbindung mit ansteigenden Titern an MV-spezifischen Antikörpern bildet damit den Wechsel von einer Th1- zu einer Th2-Antwort ab (Griffin 2010). In experimentell infizierten nicht-humanen Primaten nimmt auch die Anzahl an Th17-Zellen zu (Nelson et al. 2017). Im zeitlichen Zusammenhang steht die Persistenz von MV-RNA über Wochen bis Monate nach Elimination infektiöser Viruspartikel (Riddell et al. 2007; Lin et al. 2012). Sie wird als wesentlicher Faktor für die Entwicklung von Spätkomplikationen, lebenslanger Immunität und prolongierter Immunsuppression diskutiert (Griffin 2016).

Eine MV-induzierte Immunsuppression wurde bereits 1908 durch Pirquet aufgrund der ausbleibenden Antwort auf Tuberkulin bei MV-infizierten Patienten beschrieben (Pirquet 1908). Die Tuberkulinreaktion stellt eine Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp (Typ IV) dar, weshalb eine Beeinträchtigung zellulär-vermittelter Prozesse naheliegt. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig verstanden, qualitative sowie quantitative Immunmodulationen können beobachtet werden. So zeigen *in vitro* MV-exponierte T-Zellen eine veränderte Zytoskelettdynamik, welche zu einer gestörten Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien, sowie zu einer verminderten Adhärenz an Fibronectin führt (Muller et al.

2006; Gassert et al. 2009). Die Proliferation peripherer Lymphozyten in Antwort auf Mitogene nimmt bei MV-Kontakt ab, wobei die Zellen in der G1-Phase ihres Zellzyklus verbleiben (Avota et al. 2001; Schneider-Schaulies und Dittmer 2006). *In vivo* besteht in der akuten Phase der Infektion eine generelle Lymphopenie (Okada et al. 2000), im Verlauf wird diese durch die Expansion MV-spezifischer Lymphozyten maskiert. Wie in experimentell infizierten nicht-humanen Primaten und *in vitro* beobachtet, betrifft die Zellepletion vorwiegend CD150-positive Gedächtnis-, Plasma- und Th17-Zellen (Vries et al. 2012; Vries und Swart 2014; Laksono et al. 2018). Damit ist eine Beeinträchtigung des immunologischen Gedächtnisses mit folgender Anfälligkeit für Sekundärinfektionen erklärbar. Gestützt wird diese Hypothese auf Beobachtungen zu Veränderungen der Diversität von naiven und Gedächtnis-B-Zellen nach Masernerkrankung bei Kindern (Petrova et al. 2019).

1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) verbinden als Antigen-präsentierende Zellen angeborene und adaptive Immunität. Sie können sowohl eine Immunabwehr einleiten als auch an der Immuntoleranz gegenüber körpereigenen und harmlosen Fremddantigenen mitwirken (Banchereau und Steinman 1998; Stockwin et al. 2000; Steinman 2007). Erstmals wurden DCs 1973 von Ralph Steinmann als neuer Zelltyp in Mäusen beschrieben. Morphologisch identifizierte er diese anhand ihres unregelmäßigen Zellkörpers mit langen verzweigten Fortsätzen (Steinman und Cohn 1973).

1.2.1 Ontogenese, DC-Subtypen und Generierung *in vitro*

DCs stellen eine sehr heterogene Zellpopulation dar, deren Lokalisation und Funktion maßgeblich vom Entwicklungsstatus und weniger vom ontogenetischen Subtyp bestimmt werden.

DCs werden gemeinsam mit Monozyten und Makrophagen dem mononukleärphagozytären System zugeordnet. Trotz zahlreicher funktioneller und morphologischer Gemeinsamkeiten, können DCs immunhistochemisch von Makrophagen und Monozyten differenziert werden (Geissmann et al. 2010; Naik et al. 2013). Alle

humanen DCs exprimieren MHC-II (HLA-DR), jedoch keine typischen Zelllinienmarker wie CD3 (T-Zellen), CD19/20 (B-Zellen), CD56 (NK-Zellen), CD14 (Monozyten) und CD15 (Granulozyten). Sie entstammen der hämatopoetischen Stammzelllinie des Knochenmarks, zu ihrer Differenzierung tragen vor allem die Wachstumsfaktoren Flt-3-Ligand, M-CSF und GM-CSF bei (Caux et al. 1992; Pulendran et al. 2001). Myeloide DCs entwickeln sich aus Vorläuferzellen der myeloiden Reihe und exprimieren eine typische Kombination von Oberflächenproteinen (CD1a, CD11c, CD13, CD33, CD11b). Sie können weiterhin in CD1c-positive oder CD141-positive DCs mit jeweils charakteristischer Genexpression unterteilt werden. Plasmazytoiden DCs können sowohl myeloide als auch lymphoide Vorläuferzellen zugeordnet werden. Funktionell kennzeichnet diese die massive Ausschüttung von Typ-I-Interferon (IFN) in Antwort auf virale Infektionen (Cella et al. 1999; Siegal et al. 1999). Andere Subtypen mit funktioneller Spezialisierung wie TNF- α - und iNOS-produzierende DCs (Tip-DC) sowie myeloide Suppressorzellen (MDSC) sind beschrieben. Immunhistochemisch können außerdem CD14-positive DCs abgegrenzt werden, die ebenso wie inflammatorische DCs möglicherweise aus Monozyten entstehen (Collin et al. 2013; Segura et al. 2013). Ein hoch spezialisierter DC-Subtyp sind die bereits 1868 von Paul Langerhans beschriebenen Langerhans-Zellen (LCs) (Schuler et al. 1985; Streilein und Grammer 1989).

Unabhängig ihrer Ontogenese unterscheiden sich DCs anhand ihrer Lokalisation. Im Blut finden sich sowohl myeloide als auch plasmazytoide DCs, in nicht-lymphatischem Gewebe wie der Haut oder dem Intestinaltrakt vorwiegend hoch motile myeloide DCs, die das Gewebe kontinuierlich nach Antigenen absuchen. Aus entzündlichem Gewebe gelangen migratorische DCs in lymphatische Organe. Dort lokalisieren neben migratorischen auch residente DCs (Segura et al. 2012; Solano-Gálvez et al. 2018).

In vitro Experimente basieren zumeist auf DCs, die aus humanen Monozyten durch die Zugabe von GM-CSF und IL-4 generiert werden (Sallusto und Lanzavecchia 1994; Romani et al. 1994). Diese DCs weisen morphologische und funktionelle Gemeinsamkeiten mit DCs *in vivo* auf, sind jedoch weniger heterogen und können am ehesten mit unreifen myeloiden DCs aus inflammatorischer Umgebung verglichen werden (Merad et al. 2013; Sallusto und Lanzavecchia 1994; Segura et al. 2013).

1.2.2 Entwicklungsstadien dendritischer Zellen

Die Funktion und die Lokalisation von DCs werden maßgeblich über ihren Entwicklungsstatus bestimmt. In Geweben hoher Antigendichte wie der Haut oder dem Intestinaltrakt patrouillieren unreife DCs (iDCs) kontinuierlich. Zur Antigenerkennung tragen neben F_c-Rezeptoren (Fanger et al. 1996) insbesondere Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) bei. DCs exprimieren ein breites Spektrum an PRRs, darunter sowohl membranständige Toll-like-Rezeptoren (TLRs), Scavenger-Rezeptoren, C-Typ-Lektin-Rezeptoren wie DC-SIGN, als auch intrazelluläre NOD-like-Rezeptoren (NLRs) (Gordon 2002; Peiser et al. 2002; Benko et al. 2008). Antigene werden mittels Makropinozytose, Phagozytose oder Rezeptor-vermittelter Endozytose aufgenommen und prozessiert (Nobes und Marsh 2000; Lim und Gleeson 2011). Antigenerkennung und -aufnahme, aber auch pro-inflammatorische Zytokine induzieren einen Reifungsprozess Antigen-aufnehmender iDCs zu Antigen-prozessierenden und -präsentierenden DCs (mDCs) (Jonuleit et al. 1997; Aiba und Tagami 1998; Hartmann et al. 1999). Diese migrieren in sekundäre lymphatische Gewebe, wo sie mit T-Zellen immunologische Synapsen ausbilden können. Dabei interagiert der T-Zell-Rezeptor (TCR) mit spezifischen MHC-Komplexen, was gemeinsam mit weiteren Signalen T-Zellen aktiviert. Endogene Antigene bei Virus- oder intrazellulärer Bakterieninfektion werden über MHC-I von CD8-positiven T-Zellen, extrazelluläre Antigene klassischerweise über MHC-II von CD4-positiven T-Zellen erkannt. Letztere differenzieren nachfolgend zu Subtypen wie Th1-, Th2- oder Th17-Zellen. Alternativ können im Rahmen einer Kreuzpräsentation extrazelluläre Antigene über MHC-I eine Immunantwort mit CD8-positiven T-Zellen induzieren (Patente et al. 2018; Solano-Gálvez et al. 2018). Neben DCs wirken auch B-Zellen, Makrophagen und Monozyten als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZs). DCs sind in dieser Eigenschaft jedoch einzigartig, da sie Antigene bereits im nanomolaren Bereich erkennen, in besonderem Maße zur Kreuzpräsentation fähig sind (Jung et al. 2002) und sowohl mit naiven T-Zellen als auch mit Effektorzellen interagieren, was für die Einleitung der primären und der sekundären Immunantwort eine wesentliche Bedeutung hat (Abdul K. Abbas 2015).

Phänotypisch äußert sich die Ausreifung in einer erhöhten Oberflächenexpression von MHC-II (HLA-DR), ko-stimulatorischer Moleküle (CD40, CD80, CD86), Chemokinrezeptoren (CXCR-4) und Adhäsionsmoleküle (Integrine, L-Selektin) (Caux et al. 1994; Cella et al. 1997; Sallusto et al. 1998; Hartmann et al. 1999). Gleichzeitig werden pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-8 und IL-12 verstärkt produziert und die Endozytosekapazität reduziert (Cella et al. 1996; Verhasselt et al. 1997).

DCs sind essenziell für den Erhalt einer Immunbalance und wirken an zentraler und peripherer Immuntoleranz mit. Sie beeinflussen die negative Selektion von T-Zellen im Thymus, inaktivieren periphere T-Zellen und induzieren die Entwicklung regulatorischer T-Zellen (Steinman 2003; Patente et al. 2018). Die Fähigkeit Immuntoleranz zu vermitteln wird wesentlich vom Entwicklungsstadium bestimmt (Lutz und Schuler 2002; Manicassamy und Pulendran 2011).

1.2.3 Rolle dendritischer Zellen bei Maserninfektion

In ihrer beschriebenen Funktion agieren DCs als Induktoren der MV-spezifischen Immunantwort. Gleichzeitig wird angenommen, dass sie wesentlich zur Virusdissemination in Früh- und Spätstadien, sowie zur MV-induzierten Immunsuppression beitragen.

Die Übertragung des MV erfolgt aerogen. Aufgrund ihrer Lokalisation im respiratorischen Epithel und der Expression des Eintrittsrezeptors CD150 sind DCs neben alveolaren Makrophagen primäre Zielzellen des Virus (Swart et al. 2007; Lemon et al. 2011). Durch eine vorherige Bindung des MV an den C-Typ-Lektin-Rezeptor DC-SIGN kann dessen Aufnahme gesteigert werden. Dabei führt die MV-Bindung über die Aktivierung von sauren Sphingomyelinasen zum vertikalen Transport von CD150 an die Zelloberfläche (Avota et al. 2011).

MV-infizierte DCs weisen hinsichtlich ihres Phänotyps Ähnlichkeiten zu LPS-ausgereiften DCs auf. Sie exprimieren verstärkt MHC-II, CD40 und CD86, sowie weitere Ausreifungsmarker (Schnorr et al. 1997; Klagge et al. 2000; Servet-Delprat et al. 2000). Bei der Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren zeigen sich dahingegen signifikante Unterschiede. Während sie gleichermaßen Chemokine wie CCL-1, CCL-2, CCL-5 und CCL-19 produzieren, scheint die vermehrte Synthese von

CCL-4 und CCL-18 MV-spezifisch zu sein. Für mDCs ist ein Wechsel des Chemokinrezeptorprofils von CCR-5 zu CCR-7 wesentlich, um die direktionale Migration in Antwort auf CCR-7 bindende Chemokine wie CCL-19 und CCL-21 zu sekundären lymphatischen Organen zu gewährleisten (Caux et al. 2002). Bei MV-infizierten DCs konnte dieser Wechsel nicht nachgewiesen werden und die Chemotaxis war im Gegensatz zu LPS-ausgereiften DCs generell beeinträchtigt (Abt et al. 2009).

Durch den MV-Transport in sekundäre lymphatische Organe tragen DCs zur systemischen Dissemination bei. *In vitro* zeigen DCs trotz hoher Suszeptibilität und massiver Expression viraler Strukturproteine nur eine eingeschränkte Fähigkeit zur Bildung infektiöser Partikel. Neben der Infektion weiterer Zellen über *de novo* produzierte Viruspartikel (cis-Infektion) wird daher die Weitergabe von DC-SIGN-gebundenem Virus an T-Zellen (trans-Infektion) angenommen (Witte et al. 2008). Mit der Infektion weiterer Immunzellen tragen DCs zur akuten Lymphopenie wie auch zur prolongierten Immunsuppression nach MV-Infektion bei (sh. Abschnitt 1.1.6). Auch gibt es Hinweise auf eine beeinträchtigte Fähigkeit MV-infizierter DCs zur Induktion einer spezifischen Immunantwort. *In vitro* zeigten sich Konjugate zwischen MV-infizierten DCs und T-Zellen mehrheitlich instabil und trugen wenig zur T-Zell-Stimulation bei (Muller et al. 2006; Shishkova et al. 2007).

Die horizontale Transmission in späten Infektionsstadien erfolgt über die apikale Abgabe infektiöser MV-Partikel aus respiratorischen Epithelzellen. Voraussetzung ist dabei deren basolaterale Infektion. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass auch hier DCs als erfolgreiche Virusüberträger fungieren (Singh et al. 2016; Derakhshani et al. 2019).

1.3 Sphingosin-1-Phosphat

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktiver Sphingolipidmetabolit. Sphingolipide bilden eine äußerst diverse und komplexe Lipidgruppe, die sich über den Aminoalkohol Sphingosin als molekulares Grundgerüst definiert. Neben ihrer strukturellen Funktion als Bestandteil der Plasmamembran sind einzelne Vertreter an (patho)physiologischen Prozessen wesentlich beteiligt. Für S1P wurde dies erst 1990 etwa 100 Jahre nach Entdeckung der Sphingolipide mit der Beschreibung von S1P-vermittelter Freisetzung

von intrazellulärem Calcium festgestellt (Thudichum 1884; Ghosh et al. 1990; Zhang et al. 1991). S1P wird seitdem intensiv beforscht, wodurch heute eine Vielfalt an intra- und extrazellulären Wirkungen bekannt ist (Spiegel und Milstien 2011).

1.3.1 Metabolismus und Verteilung

S1P steht über enzymatische Reaktionen mit anderen Vertretern des Sphingolipid-metabolismus im Gleichgewicht (Abb. 3). Sphingosin resultiert aus der Spaltung von Ceramid mittels Ceramidasen. Ceramid wiederum kann sowohl *de novo* aus Serin und Acyl-Koenzym A, als auch über den Abbau Sphingomyelins, komplexer Sphingolipide oder aus Sphingosin entstehen.

Sphingolipide sind wichtige Bestandteile der Plasmamembran und können über den Aufbau von Lipiddomänen Endo- und Exozytose, Signaltransduktion sowie intrazellulären vesikulären Transport regulieren (Hannun und Obeid 2008; Shakor et al. 2011; Yuyama et al. 2012).

Die Sphingomyelin-Hydrolyse ist als definierender Faktor der vorhandenen S1P-Menge und der S1P-vermittelten Wirkung beschrieben (Osawa et al. 2013). Sie wird von Sphingomyelinasen durchgeführt, die anhand ihres pH-Optimums in 3 verschiedene Typen unterteilt werden: saure (ASM; pH 5,5), neutrale (NSM; pH 7,4) und alkalische Sphingomyelinasen (pH 9). In Antwort auf zellulären Stress, ausgelöst durch UV-Exposition, Infektionen oder inflammatorische Zytokine, werden einzelne Subtypen der ASM und NSM aktiviert (Nikolova-Karakashian et al. 2008; Simonis und Schubert-Unkmeir 2018).

Zur Synthese von S1P wird Sphingosin mittels zweier Sphingosinkinasen phosphoryliert. Diese weisen Unterschiede in Lokalisation und Funktion auf (Maceyka et al. 2005). Die Sphingosinkinase 2 (SphK2) ist vorwiegend in der unmittelbaren Umgebung des Nukleus oder anderen Zellkompartimenten zu finden. Die Sphingosinkinase 1 (SphK1) ist zytosolisch lokalisiert, wird signalabhängig an die Plasmamembran transloziert und teilweise sezerniert (Ancellin et al. 2002). Die SphK1 kann über eine Vielzahl an Faktoren aktiviert werden, darunter neben Wachstumsfaktoren wie HGF oder VEGF (Shu et al. 2002; Duan et al. 2004) auch TNF- α und LPS (Pettus et al. 2003; Fischer et al. 2011). Abhängig vom jeweiligen

Stimulus kann die SphK1 phosphoryliert oder transloziert werden oder mit Phospholipiden interagieren. Der Abbau von S1P kann reversibel (durch Lipidphosphat-Phosphohydrolasen (LPP) bzw. spezifischen S1P-Phosphatasen (SPP)) oder irreversibel (durch S1P-Lyase (SPL) zu Phosphoethanolamin und Hexadecanal) sein (Abb. 3). Mit Ausnahme der LPPs agieren die abbauenden Enzyme ausschließlich intrazellulär.

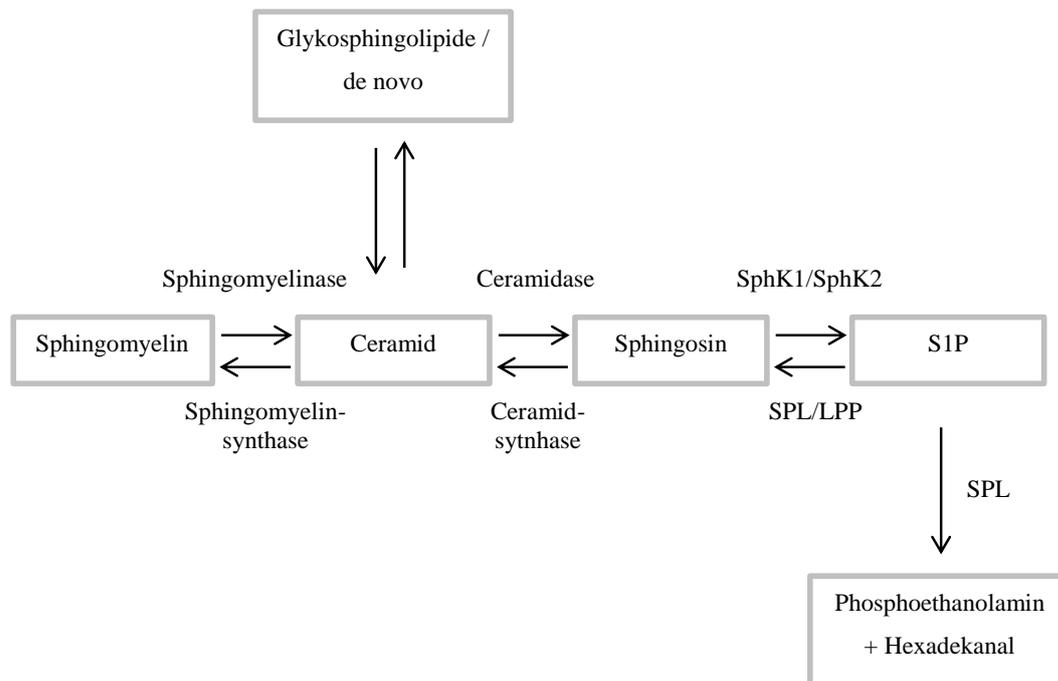


Abbildung 3: Sphingolipidmetabolismus. S1P entsteht aus der Phosphorylierung von Sphingosin mittels SphK und wird zu Phosphoethanolamin und Hexadecanal abgebaut. Sphingosin wird enzymatisch aus Ceramid hergestellt, welches durch den Abbau komplexer Glykosphingolipide, Sphingomyelins, aus Sphingosin oder *de novo* entsteht.

Obwohl die Enzyme des S1P-Metabolismus und damit auch S1P selbst ubiquitär sind, variieren die jeweiligen Konzentrationen Kompartiment-abhängig. So wurden im Blut S1P-Konzentrationen bis in den mikromolaren Bereich detektiert (Ruwisch et al. 2001), während die S1P-Konzentration in den Lymphbahnen abnimmt und im Gewebe nur noch im nanomolaren Bereich liegt (Schwab et al. 2005; Lee et al. 2007; Pappu et al. 2007; Hla et al. 2008). Dieser Gradient wird durch die unterschiedliche Produktionskapazität der Zellen bedingt. Durch Knock-Out-Tiermodelle wurden Erythrozyten als Hauptquelle von S1P im Plasma identifiziert (Pappu et al. 2007).

Aufgrund fehlender Expression degradierender Enzyme (SPL, SPP) kann gebildetes und auch aus der Umgebung aufgenommenes S1P in Erythrozyten akkumulieren (Ito et al. 2007; Hanel et al. 2007). Auf dieselbe Weise kann sich auch in Thrombozyten eine auffallend große Menge an S1P ansammeln. S1P wird von diesen nicht konstitutiv, sondern während der Gerinnung sezerniert (Yatomi et al. 1997; Ono et al. 2013; Jonnalagadda et al. 2014). Im Blut bindet S1P aufgrund seiner geringen Löslichkeit in wässrigen Medien an Plasmaproteine wie HDL oder Albumin (Yatomi et al. 2000; Murata et al. 2000). Beim Aufbau lokaler S1P-Gradienten sind Endothelzellen entscheidend (Mendoza et al. 2012; Fukuhara et al. 2012), weitere regulierende Zellen werden jedoch insbesondere innerhalb lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben diskutiert.

1.3.2 Wirkmechanismen

S1P reguliert als intra- und extrazellulärer Botenstoff multiple zelluläre Prozesse wie Proliferation, Angiogenese, Apoptose und Migration (Mizugishi et al. 2005; Simmons und Ishii 2014; Nowatari et al. 2015). Im Jahr 1990 wurde aus Endothelzellen Edg1 (S1P₁) kloniert, für das 8 Jahre später S1P als physiologischer Ligand identifiziert wurde (Hla und Maciag 1990; Lee et al. 1998). Bisher sind 5 Rezeptoren für S1P (S1P₁₋₅) bekannt. Sie sind membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und werden zelltypspezifisch exprimiert. Während S1P₁, S1P₂ und S1P₃ ubiquitär vorhanden sind, wurde S1P₄ bevorzugt in Lymphknoten, Milz, Thymus und Lunge, und S1P₅ in Gehirn, Haut, und Milz detektiert (Anliker und Chun 2004). Eine Aktivierung der Rezeptoren initiiert über G_i-, G_q- oder G_{12/13}-Interaktion unterschiedliche Signalkaskaden und anschließend pleiotrope Effekte (Spiegel und Milstien 2003; Sanchez und Hla 2004).

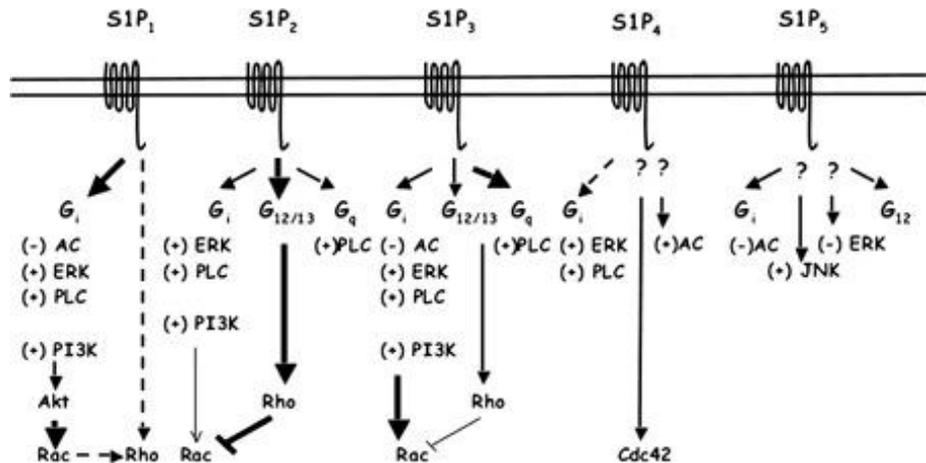


Abbildung 4: Signaltransduktion der S1P-Rezeptoren. Mit Genehmigung aus (Sanchez und Hla 2004).

Als Chemokin induziert extrazelluläres S1P über S1P₁ zahlreiche Migrationsprozesse. Vor allem auf Immunzellen wirkt S1P als chemotaktischer Stimulus, der die Positionierung von Lymphozyten, Makrophagen, Neutrophilen, Mastzellen und DCs sowohl unter homöostatischen als auch inflammatorischen Bedingungen beeinflusst (Jolly et al. 2004; Schwab und Cyster 2007; Jenne et al. 2009; Rathinasamy et al. 2010). S1P vermittelt nach Reifungsprozessen von B-Zellen im Knochenmark und T-Zellen im Thymus deren Eintritt ins Blut. (Matloubian et al. 2004; Allende et al. 2010). Ebenso ist es neben weiteren Chemokinen entscheidend für die anschließende kontinuierliche Zirkulation naiver Lymphozyten zwischen sekundären lymphatischen Organen und Blutkreislauf. Hier erfolgt bei hoher S1P-Konzentration im Blutkreislauf eine Internalisierung von S1P₁, woraufhin chemotaktische Signale durch CCL-19, CCL-21 und CXCL-12 an Bedeutung gewinnen und den Eintritt in sekundäre lymphatische Organe vermitteln (Liu et al. 1999; Forster et al. 1999; Scimone et al. 2004). Dort wird wiederum verstärkt S1P₁ exprimiert mit folgendem Austritt ins Blut (Matloubian et al. 2004; Pham et al. 2008). Die Transitdauer im sekundären lymphatischen Gewebe kann durch die Modulation kompetitiver chemotaktischer Signale verlängert werden, was unter inflammatorischen Bedingungen durch eine membranäre CD69-S1P₁-Interaktion mit folgender Internalisierung und Degradierung erfolgt (Bankovich et al. 2010; Mackay et al. 2015).

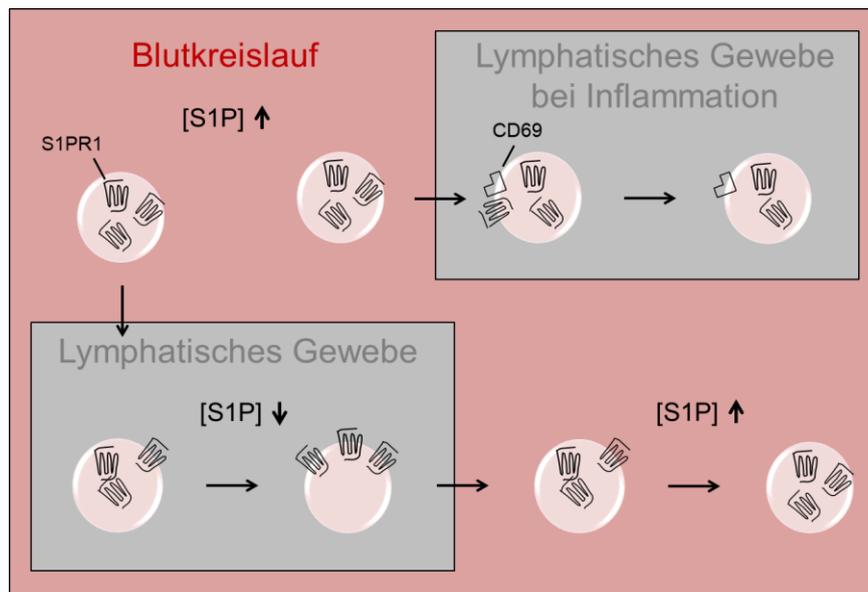


Abbildung 5: Regulation S1P₁-Expression (S1PR1) im Rahmen der T-Zell-Zirkulation. Im Blutkreislauf wird bei hoher extrazellulärer S1P-Konzentration S1P₁ internalisiert, der Eintritt von T-Zellen ins lymphatische Gewebe über CCL-19, CCL-21 und CXCL-12 reguliert. Dort erfolgt bei niedriger extrazellulärer S1P-Konzentration die Hochregulation von S1P₁ mit folgendem Austritt in den Blutkreislauf. Dieser Hochregulation kann unter inflammatorischen Bedingungen CD69 entgegenwirken.

S1P₂ vermittelt unterschiedliche Migrationsbewegungen bei Immunzellen: chemotaktische für intranoduläre B-Zellen (Green et al. 2011) und repulsive für Makrophagen (Michaud et al. 2010). Auch bei Zellen außerhalb des Immunsystems vermitteln S1P-Rezeptoren chemotaktische Signale. Die Ausbildung von fokalen Kontakten zur Migration von Endothelzellen wird S1P-abhängig durch S1P₁ und S1P₃ initiiert (Paik et al. 2001). Bei der Kardiogenese, Neurogenese und Angiogenese ist S1P ein wichtiger chemotaktischer Stimulus (Kupperman et al. 2000; Mizugishi et al. 2005; Gaengel et al. 2012). Neben diesen migrationsregulatorischen Eigenschaften kann S1P die Degranulation von Mastzellen (Jolly et al. 2004), die Antigen-Aufnahme durch DCs sowie deren Zytokinsynthese regulieren (Schroder et al. 2011; Japtok et al. 2012). Zahlreiche der extrazellulären Effekte S1Ps werden über sogenanntes Inside-Out-Signaling vermittelt, wobei intrazellulär produziertes S1P sezerniert wird und anschließend para- oder autokrin wirkt.

Als intrazellulärer Botenstoff realisiert S1P die Regulation des Calcium-Spiegels, der Apoptose und der Proliferation. Hinsichtlich des zellulären Überlebens weisen die Sphingosinkinasen diskrepante Eigenschaften auf, wobei SphK1 im Gegensatz zu SphK2 einen wachstums- und proliferationsfördernden Effekt hat (Maceyka et al. 2005). Lange blieb unklar, wie S1P intrazellulär Effekte evozieren kann. In den vergangenen 10 Jahren wurden jedoch verschiedene Zielstrukturen identifiziert, die unter anderem eine epigenetische Beeinflussung über Histondeacetylasen sowie die Aktivierung des NF- κ B-Signalweg nahelegen (Hait et al. 2009; Alvarez et al. 2010).

1.3.3 Pathogenetische Bedeutung

Eine Beteiligung von S1P ist für verschiedene pathologische Situationen beschrieben. Gut untersucht ist beispielsweise der Einfluss S1Ps und der SphK1 auf neoplastische Zellen, deren Wachstumsverhalten, Apoptoseresistenz, Angiogenese und Metastasierung *in vitro* und *in vivo* durch S1P gefördert werden (Pyne und Pyne 2010). Die immunmodulatorischen Eigenschaften machen S1P als wesentlichen pathogenetischen Faktor chronisch entzündlicher Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Colitis ulcerosa oder Psoriasis wahrscheinlich (Bourgoin und Zhao 2010; Pyne und Pyne 2013; Checa et al. 2015). Die S1P-Signaltransduktion eignet sich daher auch als Zielstruktur zur Behandlung entzündlicher, autoimmunologischer und allergischer Erkrankungen. Fingolimod (FTY720) wurde bereits 2010, Siponimod 2019 in ihrer Funktion als S1P-Antagonisten zur Behandlung der multiplen Sklerose zugelassen (Cartier und Hla 2019). In Tiermodellen wurden für weitere S1P-Rezeptormodulatoren, für Sphingosinkinase-Inhibitoren sowie für den monoklonalen Antikörper Sphingomab therapeutische Effekte gezeigt (Visentin et al. 2006; Daniel et al. 2007; Nishiuma et al. 2008; Poti et al. 2013). Ein Inhibitor der S1P-Lyase wird derzeit zur Therapie der rheumatoiden Arthritis in klinischen Studien der Phase II getestet (Bagdanoff et al. 2010).

1.4 Bedeutung von Chemokinen für die Koordination von T-Zellen und DCs

Chemokine stellen eine Untergruppe von Zytokinen mit bisher über 50 identifizierten endogenen Liganden dar und werden über ihre Fähigkeit zur Induktion von Chemotaxis definiert. Zur Signaltransduktion kommt es durch die Interaktion mit Chemokinrezeptoren, welche im allgemeinen G_i-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind. Die resultierende Chemotaxis initiiert und koordiniert die Positionierung von Immunzellen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen (Zlotnik und Yoshie 2012; Bachelier et al. 2014; Griffith et al. 2014).

Bei akuter Inflammation ist eine räumliche Nähe zwischen T-Zellen und DCs am Entzündungsfokus und in sekundären lymphatischen Organen entscheidend. Im entzündeten Gewebe wird der Eintritt von Lymphozyten durch inflammatorische Chemokine wie CCL-2 oder CCL-3 gefördert, die neben Mastzellen, Makrophagen und Granulozyten auch von DCs produziert und freigesetzt werden (Sallusto et al. 1999; Marshall 2004; Piqueras et al. 2006; Khan et al. 2006; Gonzalo et al. 2007). Mit der Ausreifung der DCs verändert sich deren Chemokin- und Chemokinrezeptorprofil (Sallusto et al. 1998). Dabei erfolgt unter anderem eine Induktion der Expression des Rezeptors CCR-7, infolgedessen mDCs entlang eines Gradienten in drainierende Lymphknoten gelangen (Caux et al. 2002; Tal et al. 2011). Auch für T-Zellen determiniert CCR-7 die Bewegungsrichtung, wodurch mDCs und T-Zellen in T-Zell-Arealen akkumulieren (Baekkevold et al. 2001; Weber et al. 2013). Innerhalb dieses Areals kann die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen mDCs und T-Zellen durch eine Regulation der Migrationsgeschwindigkeit von T-Zellen erhöht werden. Dies ist angesichts der geringen Anzahl Antigen-spezifischer T-Zellen für eine schnelle Einleitung der Immunantwort bedeutsam. Chemokine, die darauf Einfluss nehmen, sind CCL-19 und CCL-21 (Okada und Cyster 2007; Worbs et al. 2007). CCL-19, nicht jedoch CCL-21 wird von mDCs produziert (Piqueras et al. 2006; Abt et al. 2009). Es wurde beobachtet, dass die spezifische Deletion des zugehörigen Chemokinrezeptors CCR-7 sich negativ auf die intranodale T-Zellmotilität auswirkt, jedoch nicht im selben Ausmaß wie eine unspezifische Hemmung G_i-Protein-gekoppelter Rezeptoren mittels Pertussis-Toxin (Okada und Cyster 2007). Daher

werden für die Interaktion zwischen DCs und T-Zellen im Rahmen der initialen Immunantwort und der nachfolgenden Entwicklung zu Effektor- bzw. Gedächtniszellen weitere Chemokine angenommen (Sallusto und Lanzavecchia 2000; Castellino et al. 2006; Hickman et al. 2011).

1.5 Zielsetzung

DCs sind in immunologische Prozesse unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen maßgeblich involviert, und dabei sowohl in ihrer Antigen-aufnehmenden als auch in ihrer Antigen-präsentierenden Rolle herausragend. Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung im Immunsystem stellen sie Zielzellen lymphotroper Erreger dar, fördern deren weitere Dissemination und sind auf diese Weise an der Pathogenese der MV-Infektion beteiligt. Vorherige Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten, dass eine MV-Interaktion mit DCs Sphingomyelinasen aktiviert und dies für den verstärkten Eintritt des Virus in die DC von Bedeutung ist. Über den nachfolgend durch MV regulierten Sphingolipidmetabolismus sowie dessen Konsequenzen für die S1P-Produktion und die DC-Aktivität war nichts bekannt.

Der Fokus im ersten Teil der Arbeit lag daher auf quantitativen Erhebungen zum S1P-Gehalt und S1P-Metabolismus in DCs verschiedener Entwicklungsstadien, sowie deren Modulation durch MV. Aufgrund des Reaktionsgleichgewichts waren nicht nur S1P selbst, sondern auch weitere Zwischenprodukte und enzymatische Reaktionen des Sphingolipidmetabolismus von Interesse. Im zweiten Teil der Arbeit wurden funktionelle Konsequenzen dieser S1P-Produktion untersucht, wobei die Frage nach einem Beitrag als potentieller chemotaktischer Stimulus zur Interaktion zwischen DCs und T-Zellen adressiert wurde.

2. Material

2.1 Geräte

Brutschrank Heracell™	Thermo Fisher Scientific
FACS Calibur - Durchflusszytometer	Becton Dickinson
Fluorimeter Safire ²	Tecan
Gelelektrophoresekammer	Institutswerkstatt
Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 780	Zeiss
Lichtmikroskop Labovert FS	Leitz
Mehrkanalpipetten	Abimed
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein
PCR-Maschine PTC-200 Thermo Cycler	MJ Research
Photometer	Eppendorf
Spannungsquelle	Pharmacia
Sterilarbeitsbank	Nuaire
Vortex	GLW
Wasserbad	GFL
Zentrifuge Heraeus™ Pico™	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich

2.2 Datenverarbeitungsprogramme

Cell Quest Pro	Becton Dickinson
FlowJo	Tree Star Inc
LSM Image Browser	Carl Zeiss
ZEN	Carl Zeiss
Image J	NIH
AIDA	Raytest
Prism	GraphPad

2.3 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten (5 ml, 10 ml)	Greiner bio-one
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson
Filterpipettenspitzen SurPhob SafeSeal®	Biozym
Kryokonservierungsröhrchen	Greiner Bio One
MS Columns	MACS Milteny Biotec
OctoMACS™ Separator	MACS Milteny Biotec
MACS MultiStand	MACS Milteny Biotec
Nylonwolle	G. Kisker GbR
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH
Corning® Transwell® Polycarbonatfilter	Sigma-Aldrich
PVC-Schlauch	Hartenstein

μ-Slide VI ^{0.4} ibiTreat	Ibidi
Spritzen (50 ml)	Dispomed
UV-Küvette mikro	Brand
Wasser (HPLC-Grade)	AppliChem
Zellkulturflaschen (50 ml, 250 ml, 550 ml)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-Well)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten schwarz (96-Well, non treated)	Nunc
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one

2.4 Kits

First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit	Thermo Scientific
Pan Monocyte Isolation Kit	MACS Milteny Biotec
Phusion High Fidelity PCR Kit	Thermo Scientific

2.5 Reagenzien

Hier werden lediglich die verwendeten Reagenzien und deren Herkunft aufgelistet. Die Lösungen der Testsubstanzen sind in Abschnitt 2.6. beschrieben.

2.5.1 Primer

Die in Tabelle 1 genannten Primer wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Primer.

	Vorwärts-Primer 5'	Rückwärts-Primer 5'	Produkt
Aktin	TGACCCAGATCATGTTTG AGA	ACTCCATGCCCAGGAAG GA	456 bp
SphK1	CTGGGACGCTCTGGTGGT CAT	CAAGGTGTGCATCTACCG GGC	572 bp
SphK2	TGAACGGGCTCCTAGATC GCC	GACAGGATGGGCAGGGG TTCT	574 bp
SPL	AGCTCACCAGGAAGATG CCCA	CATTGCCCGCACATCCAC CTC	554 bp

2.5.2 siRNA

Zur Transfektion der DCs wurde siRNA der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Dabei wurden sowohl Sequenzen selbst generiert, als auch eine Mission® esiRNA mit dem Zielgen der SphK1 und eine universelle negative si-RNA-Kontrolle eingesetzt.

Tabelle 2: Sequenzen der generierten siRNAs.

	Sense 5'	Antisense 5'
SphK1	GAGCUGCAAGGCCUUGCCC[dT][dT]	GGGCAAGGCCUUGCAGCUC[dT][dT]
SphK2	CAGGAUUGCGCUCGCUUUC AU[dT][dT]	AUGAAAGCGAGCGCAAUCC UG[dT][dT]

2.5.3 Antikörper

Anti-human CD14 APC-conjugated	ImmunoTools
Anti-human CD3 FITC-conjugated	ImmunoTools
Anti-human CD363 (S1P ₁) eFluor®-660-conjugated	eBioscience
Anti-human CD86 APC-conjugated	ImmunoTools
Anti-human HLA-DR FITC-conjugated	ImmunoTools

Mouse IgG1 κ control eFluor®-660-conjugated	eBioscience
Mouse IgG1 control APC-conjugated	ImmunoTools
Mouse IgG2 α control FITC-conjugated	ImmunoTools
Mouse IgG1 control FITC-conjugated	ImmunoTools
MV-N unconjugated	Virolog. Institut Würzburg
Anti-mouse IgG Superclonal™ Alexa-Fluor®-488-conjugated	Thermo Fisher Scientific
2.5.4 Fluoreszierender Farbstoff	
Carboxyfluorescein (5-, 6-) diacetat (CFSE)	Thermo Fisher Scientific
Propidiumiodid	eBioscience
2.5.5 Zytokine und Chemokine	
IL-1 β	MACS Miltenyi Biotec
IL-4	MACS Miltenyi Biotec
IL-6	MACS Miltenyi Biotec
Leukine® Sargramostim (GM-CSF)	Immunex
PGE ₂	Cayman Chemical
SDF-1 α	Sigma-Aldrich
TNF- α	MACS Miltenyi Biotec
2.5.6 Weitere Reagenzien	
Agarose	AppliChem
ATP (100 mM)	Thermo Fisher Scientific
BSA Albumin Fraktion V (pH 7,0)	AppliChem

Counterbeads Calibrite™ unlabeled	Becton Dickinson
DharmaFECT™ Transfection Reagents	GE Healthcare
Ethanol	Applichem
FBS	Biochrome
Fusionsinhibitorisches Peptid (FIP: Z-D-Phe-Phe-Gly-OH)	Bachem
GelRed™	Biotium
GeneRuler™ DNA Ladders (100 bp)	Thermo Fisher Scientific
Histopaque® - 1077	Sigma Aldrich
HMU-PC	Moscerdam
LPS	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 Gibco™	Thermo Fisher Scientific
SKI-II	Sigma-Aldrich
TRIzol®	Thermo Fisher Scientific
VPC 23019	Cayman Chemical
X-Vivo™ 15 Medium	Lonza

2.6 Puffer und Lösungen

2.6.1 Zellisolation und -kultivierung

Tabelle 3: Verwendete Lösungen zur Isolation, Kultivierung und Quantifizierung von Zellen.

Puffer/Lösung	Inhaltsstoffe
ATV (Medienküche des Instituts)	136,9 mM NaCl 5,4 mM KCl 5,6 mM D(+)-Glucose 6,9 mM NaHCO ₃ 21,5 µM Trypsin 0,7 mM Versen pH 7,4
Monozytenisolationspuffer	0,5 % (w/v) BSA 2 mM EDTA ad PBS (pH 7,2)
PBS (Medienküche des Instituts)	1,4 M NaCl 26,8 mM KCl 71,9 mM Na ₂ HPO ₄ 14,7 mM KH ₂ PO ₄
Trypanblaulösung	0,25 % (w/v) ad PBS
Versen (Medienküche des Instituts)	536,6 µM KCl 293,9 µM KH ₂ PO ₄ 805,9 µM Na ₂ HPO ₄ 28,1 mM NaCl 136,9 µM Versen

2.6.2 Durchflusszytometrie

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen zur durchflusszytometrischen Analyse.

Puffer/Lösung	Inhaltsstoffe
FACS-Puffer	0,5 % (w/v) BSA 0,02 % (w/v) NaN ₃ ad PBS
Paraformaldehydlösung	2 % (w/v) Paraformaldehyd ad PBS
Saponin-Puffer	0,33 % (v/v) ad FACS-Puffer

2.6.3 RNA-Analytik

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen zur RNA-Analytik.

Puffer/Lösung	Inhaltsstoffe
Negative siRNA-Kontrolle	40 µM ad H ₂ O
Primer	10 µM ad H ₂ O
Reaktionsansatz der PCR	2 µl cDNA-Lösung bzw. H ₂ O 4 µl 5 x Phusion HF Puffer 0,4 µl dNTPs 1 µl Vorwärtsprimer 1 µl Rückwärtsprimer 0,6 µl DMSO 11 µl H ₂ O 0,2 µl Phusion DNA-Polymerase
siRNA	20 µM ad H ₂ O
TAE-Puffer 50x	2,0 M Tris (pH 8,0) 0,1 M EDTA 1,0 M Essigsäure ad H ₂ O

2.6.4 ASM-/NSM-Assay

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen zur Messung der Sphingomyelinasen-Aktivität.

Puffer/Lösung	Inhaltsstoffe
ASM HMU-PC-Lösung	1,35 mM HMU-PC ad ASM Substratpuffer
ASM Lysis-Puffer	ASM Substratpuffer
ASM Reaktionsansatz	10 µl Probe 10 µl ASM HMU-PC-Lösung 10 µl ASM Substratpuffer 1,3 µl EDTA (30 mM, pH 5,5)
ASM Substratpuffer	0,1 M Natriumacetat 0,2 % (w/v) Natriumtaurocholat pH 5,2
NSM HMU-PC-Lösung	1,35 mM HMU-PC ad NSM Substratpuffer
NSM Lysis-Puffer	20 mM HEPES 0,1 % Triton X-100 0,2 % Chaps

	1 mM Na ₃ VO ₄ 10 mM β-Glycerolphosphat 10 mM MgCl ₂ pH 7,4
NSM Reaktionsansatz	10 µl Probe 10 µl NSM HMU-PC-Lösung 10 µl NSM Resuspensionspuffer 2,2 µl ATP (100 mM, pH 7,3-7,5)
NSM Resuspensionspuffer	20 mM Hepes 2mM EDTA 10 mM MgCl ₂ 5 mM DTT 0,1 mM Natriummetavanadat 10 mM Glycerolphosphat pH 7,4
NSM Substratpuffer	0,1 M Natriumacetat pH 7,4
Stopp-Puffer	0,2 M Glycin 0,2 M NaOH 0,25 % TritonX pH 10,7

2.6.5 Migrationsassays

Zur Herstellung des Migrationsmediums wurde RPMI 1640 mit 0,5 % (w/v) BSA versetzt.

2.6.6 Lösungen weiterer Reagenzien

Tabelle 7: Auflistung der Reagenzien mit Lösungsmittel.

Substanz	Lösung
FIP	250 mg (200 mM) ad 2,5 ml DMSO
GM-CSF	500 µg ad 27 ml RPMI 1640 (100 U / µl)
IL-1	10 µg ad 1 ml RPMI 1640
IL-4	25 µg ad 25 ml RPMI 1640
IL-6	10 µg ad 1 ml RPMI
LPS	100 µg ad 1 ml PBS
PGE₂	1 mg ad 1 ml RPMI 1640
SDF-1α	10 µg

	0,1 % (w/v) BSA ad 1 ml PBS
SKI-II	ad DMSO (10mM)
TNF-α	10 μ g ad 1 ml RPMI 1640
VPC 23019	1 mg ad 60 μ l DMSO (50 mM)

2.7 Zellen und Viren

Die verwendeten Zelllinien (BJABs, B95a, Jurkat-T-Zellen) wurden von der Arbeitsgruppe Schneider-Schaulies zur Verfügung gestellt. Die Isolation primärer Zellen erfolgte aus Leukozytendepletionskammern, welche von der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Universität Würzburg bereitgestellt wurden. Dabei stimmten die Spenderinnen und Spender der Ethikvereinbarung der Ethikkommission der Universität Würzburg zu (Zeichen 2015110501). Der verwendete Wildtyp-Virus Fleckenstein (WTF) der Arbeitsgruppe Schneider-Schaulies wurde wie in Abschnitt 3.2.1 hergestellt.

3. Methoden

3.1 Gewinnung und Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37 °C. Die Atmosphäre war wasserdampfgesättigt und enthielt 5 % CO₂. Die verwendeten Medien wurden mit Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) versetzt und vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Bei Hinzufügen von fetalem Kälberserum (FBS) wurde dieses zunächst für 1 h bei 56 °C hitzeinaktiviert. Das Arbeiten mit Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen.

3.1.1 Quantifizierung vitaler Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden Neubauerzählkammern genutzt. Um dabei tote Zellen zu identifizieren, erfolgte vor Zählung eine Vitalitätsfärbung mit Trypanblau. Dieser Farbstoff wird aufgrund der verletzten Integrität der Zellmembran von toten Zellen aufgenommen. Vitale Zellen bleiben ungefärbt. Die zu zählende Zellsuspension wurde 1:2 bis 1:10 mit Trypanblau verdünnt und anschließend in die Neubauerzählkammer gegeben. Mit Hilfe des Lichtmikroskops erfolgte die Bestimmung der Zellzahl über die hier abgebildete Formel.

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Mittelwert der 4 Großquadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Formel 1: Berechnung der Anzahl vitaler Zellen.

3.1.2 Kultivierung von Suspensionszelllinien

Die humane B-Zelllinie BJAB sowie die humane Jurkat-T-Zelllinie wurden in RPMI 1640 mit 10 % FBS kultiviert. Zum Erhalt einer Dichte von 4×10^5 Zellen / ml wurden die Zellen regelmäßig gesplittet. Dabei wurde die Zellsuspension zentrifugiert

(5 min, 1200 rpm, RT), das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und mit der bereits genannten Zelldichte in Kulturflaschen ausgesät.

3.1.3 Zellkultur adhärenter Zelllinien

Die semiadhärente Epstein-Barr-Virus-transformierte B-Zelllinie B95a wurde in RPMI 1640 mit 5 % FBS kultiviert. Bei Ausbildung eines konfluenten Zellrasens erfolgte das Splitten der Zellen. Hierfür wurden die Zellen mit ATV gewaschen und abgelöst. Für die weitere Kultur wurden sie verdünnt (1:5 - 1:10) in neue Zellkulturflaschen gegeben.

3.1.4 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Bluts

Als mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) werden einkernige Leukozyten wie Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen zusammengefasst. Die Isolation dieser Zellen erfolgte aus dem Blut gesunder Spenderinnen und Spender, wofür von der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Universität Würzburg sogenannte Leukozytendepletionsfilter bereitgestellt wurden.

Das Leukozytenkonzentrat dieser Filter wurde zunächst 1:5 mit Versene verdünnt und dann auf Histopaque (9 ml Histopaque pro 25 ml verdünntem Blut) geschichtet. Die anschließende Dichtegradientenzentrifugierung (30 min, 1200 rpm, RT) führte zur Auftrennung der zellulären Bestandteile nach Dichte. Dabei entstand eine Interphase, welche den PBMCs entsprach. Diese wurden in ein Röhrchen überführt und dreimal mit 50 ml PBS gewaschen (5 min, 1200 rpm, RT). Die gewonnenen PBMCs wurden mit einer Zelldichte von 5×10^6 / ml in RPMI / 10 % FBS eingesetzt und konnten nun für die Isolierung von Monozyten und T-Zellen verwendet werden.

3.1.5 Isolierung humaner Monozyten

Zur Trennung der Monozyten von den übrigen PBMCs standen 2 Methoden zur Verfügung.

3.1.5.1 Negative Selektion über magnetische Antikörper

Diese Methode wurde zur Gewinnung von Proben für die Lipidomic-Analysen genutzt. Die Isolation erfolgte über das Pan Monocyte Isolation Kit. Dabei werden Nicht-Monozyten beim Durchlaufen einer Säule (MS Columns) über magnetische Antikörper

an der Säulenwand arretiert. Pro Säule wurden $1,5 \times 10^7$ PBMCs eingesetzt. Das Zellpellet wurde nach Zentrifugierung (5 min, 1200 rpm, RT) in 30 μ l Isolationspuffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Verhinderung einer unspezifischen Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren wurden der Probe 10 μ l FcR-Blocker und anschließend 10 μ l des Biotin-Antikörper-Gemisches zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei 2 - 8 °C erfolgte eine erneute Zugabe von 30 μ l Isolationspuffer und 20 μ l Anti-Biotin-Microbeads. Die Probe wurde für 10 min bei 2 - 8 °C inkubiert, nach dem Eingeben von 1 ml Isolationspuffer zentrifugiert (1 min, 8000 rpm, RT) und in 500 μ l Isolationspuffer resuspendiert. Die negative Selektion der Monozyten erfolgte im magnetischen Feld eines MACS-Separators. Vor und nach Eingabe der Probe wurde die Säule mit 500 μ l Isolationspuffer gespült. Die in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangenen Zellen entsprachen der angereicherten Monozytenfraktion.

3.1.5.2 Isolation über Plastikadhärenz

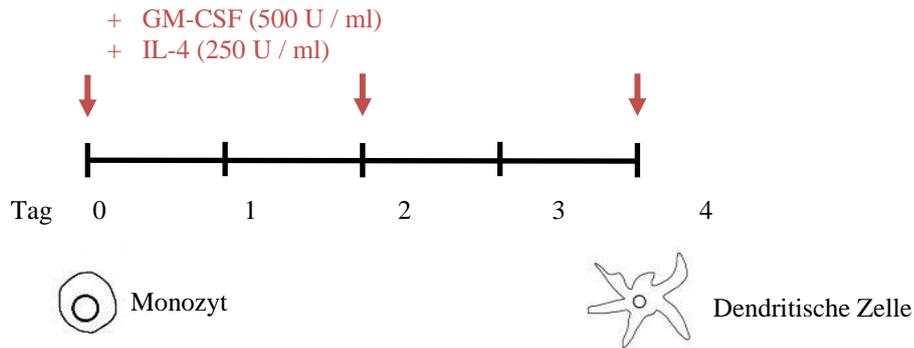
Abgesehen von den Proben für die Lipidomics-Analyse wurden die in dieser Arbeit verwendeten Monozyten über ihre Fähigkeit zur Plastikadhärenz angereichert. Hierzu wurden pro Zellkulturflasche (550 ml) 25 ml der PBMC-Suspension liegend für 2 h bei 37 °C inkubiert (Liegefläche: 175 cm²). Die nicht-adhärenente Zellfraktion wurde anschließend abgenommen und die adhärenente Zellfraktion dreimal mit PBS (37 °C) abgespült. Diese Zellfraktion stellte die angereicherte Monozytenfraktion dar.

3.1.6 Generierung und Kultur dendritischer Zellen aus Monozyten *in vitro*

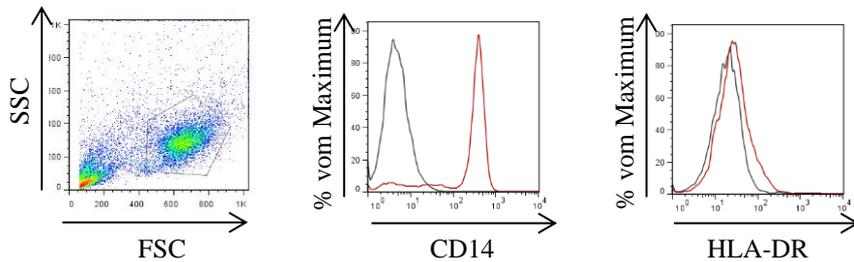
Humane DCs können *in vitro* über die Zugabe der Differenzierungsfaktoren GM-CSF und IL-4 aus Monozyten generiert werden. Zur Trennung der Monozyten von den übrigen PBMCs, standen die oben genannten Methoden zur Verfügung. Die so gewonnenen Monozyten wurden zu einer Dichte von 6×10^5 / ml in Zellkulturflaschen eingesetzt. Als Medium diente RPMI / 10 % FBS, welches mit den Differenzierungsfaktoren GM-CSF (500 U / ml) und IL-4 (250 U / ml) versetzt wurde. Alle 2 Tage erfolgten die Überprüfung der Zelldichte und die Zugabe der Differenzierungsfaktoren. Bei einer Dichte von weniger als 6×10^5 / ml wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 1200 rpm, RT) und mit einer Zellkonzentration von 6×10^5 / ml erneut in das bereits genutzte Medium eingesetzt. Nach einer derartigen

Kultur über 4 Tage wurde die Generierung von iDCs durchflusszytometrisch mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmoleküle (CD14, CD86, HLA-DR) überprüft. Abbildung 6 stellt diese Methode graphisch dar.

A



B



C

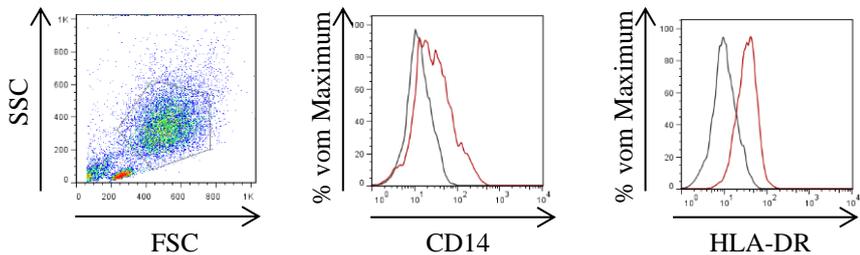


Abbildung 6: Generierung humaner dendritischer Zellen. Das Gate für Monozyten und DCs wird, wie in 3.4.1 beschrieben, anhand der Granularität und Zellgröße gewählt. Während der 4 tägigen Kultur in RPMI / 10 % FBS werden alle 2 Tage Differenzierungsfaktoren (rote Pfeile) zugeben (A). Die Monozyten an Tag 1 exprimieren ihren typischen Oberflächenmarker CD14 und sind für HLA DR negativ (B). Dahingegen verliert sich die Expression von CD14 nach 4 tägiger Kultur und die Zellen sind positiv für HLA DR, einem typischen Marker für DCs (C).

3.1.7 Ausreifung dendritischer Zellen

Die Ausreifung dendritischer Zellen erfolgte anhand von 2 Protokollen. Protokoll 1 (P1) basierte auf LPS (Endkonzentration: 100 ng / ml) als Ausreifungsinduktor, Protokoll 2 (P2) auf TNF- α (Endkonzentration: 10 ng / ml) zusammen mit PGE₂ (Endkonzentration: 1 μ g / ml), IL-1 β (Endkonzentration: 10 ng / ml) und IL-6 β (Endkonzentration: 10 ng / ml). In beiden Fällen wurden die Ausreifungsinduktoren 24 h vor Experiment der Zellkultur zugegeben. Die erfolgreiche Behandlung konnte durchflusszytometrisch überprüft werden (Abb. 7).

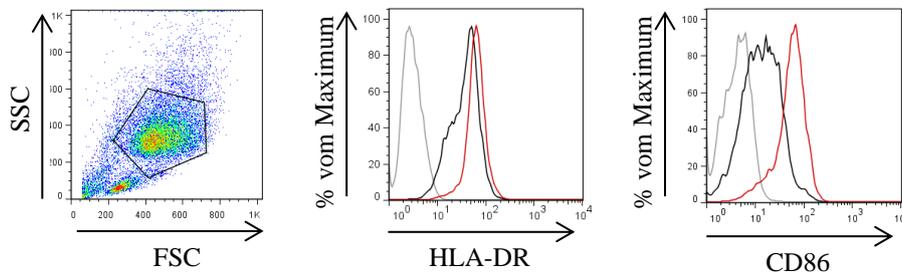


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Charakterisierung ausgereifter dendritischer Zellen. Das Zellgate für DCs wird, wie in 3.4.1 beschrieben, über Granularität und Größe festgelegt. Die Oberflächenmarker HLA-DR und CD86 werden von DCs exprimiert, wie dem Vergleich zum Isotyp (hellgraue Linie) entnommen werden kann. HLA-DR wird von iDCs nur gering exprimiert, ebenso CD86 (dunkelgraue Linie). Nach Ausreifung werden beide Marker verstärkt exprimiert, wobei der Effekt bei CD86 deutlicher ist (rote Linie).

3.1.8 Anreicherung und Kultur primärer T-Zellen

Die Anreicherung primärer T-Zellen erfolgte mittels negativer Selektion bei der Passage von PBMCs über Nylonwolle. Während T-Zellen mit sehr niedriger Affinität an Nylon binden, ist dies für andere mononukleäre Zellen nicht der Fall. Für die Methode wurden Säulen aus 50 ml Spritzen hergestellt, indem diese mit 2 g Nylonwolle gefüllt, autoklaviert und anschließend an ihrem unteren Ende mit einem PVC-Schlauch versehen wurden. Zum Verschließen des PVC-Schlauchs diente eine Metallklemme. Vor der Verwendung wurde die Säule mit 30 ml RPMI / 5 % (37 °C) gespült, wobei mit einer Pipette Luftblasen innerhalb der Nylonwolle entfernt wurden. Anschließend

erfolgte eine Zugabe von RPMI / 5 % unter geschlossener Klemme. Nach diesen Vorbereitungen wurden $1,5 \times 10^8$ PBMCs in 7 ml RPMI / 5 % FBS aufgenommen und auf die Säule gegeben. Daraufhin wurde nochmals Medium abgelassen, sodass sich die Zellsuspension innerhalb der Nylonwolle befand. Zum Schutz vor Austrocknung wurden weitere 5 ml RPMI / 5 % FBS zugegeben und die Säule für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die verwendeten PBMCs entsprachen dabei der nicht-adhärenenten Fraktion beim Isolationsvorgang von Monozyten. Beim anschließenden Öffnen der Klemme wurden von diesen PBMCs aufgrund ihrer geringen Affinität zu Nylon lediglich T-Zellen in einem 50 ml-Röhrchen aufgefangen. Zur besseren Ausbeute wurde die Säule mit 25 ml RPMI / 5 % FBS nachgespült. Die Kultur der T-Zellen erfolgte mit einer Dichte von 5×10^6 / ml. Als Kulturmedium diente RPMI / 10 % FBS oder serumfreies X-Vivo. Die erfolgreiche Anreicherung der T-Zellen konnte anhand von CD3-Antikörpern durchflusszytometrisch gemessen werden (Abb. 8).

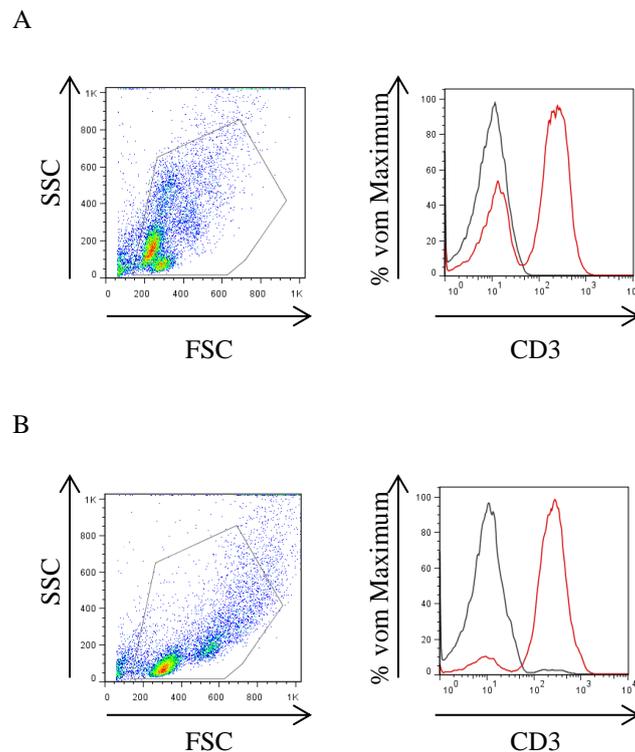


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Charakterisierung der T-Zellanreicherung. Aufgrund unterschiedlicher Affinitäten werden PBMCs bei Passage über Nylonwolle aufgetrennt und dabei T-Zellen negativ selektioniert. Der Anteil an T-Zellen (CD3-positiv) erhöht sich von 64,7 % vor der Passage (A) auf 89,4 % danach (B).

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Herstellung von Virusstocks

Der in dieser Arbeit verwendete MV-Wildstammtyp WTF wurde mit Hilfe der Suspensionszelllinie BJAB gezüchtet. Für die Präinfektion wurden zunächst 5×10^7 Zellen verwendet, die nach Zentrifugierung (5 min, 1200 rpm, RT) in 7 ml RPMI 1640 resuspendiert wurden. Es folgte die Infektion der BJABs mit einer MOI von 0,01 und eine zweistündige Inkubation bei 37 °C. Zur besseren Virusbindung wurde die Suspension während dieser Zeit mehrfach gewendet. Nach erneutem Zentrifugieren (5 min, 1200 rpm, RT) wurde das Zellpellet in 50 ml RPMI / 10 % FBS aufgenommen und bei 37 °C für 2 - 3 Tage kultiviert. Der genaue Zeitraum hing vom Ausmaß des zytopathischen Effekts (CPE) ab. Bei deutlichem CPE wurden jeweils 10 ml der Zellsuspension der Präinfektion zu einer Zellkulturflasche (550 ml) mit BJABs gegeben, welche anschließend für weitere 2-3 Tage bei 37 °C bis zur Ausbildung eines CPE inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (5 min, 1200 rpm, RT) wurden die infizierten BJABs in je 1 ml PBS aufgenommen und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Anschließend erfolgte mit Hilfe eines Homogenisator Kolbens die mechanische Zerstörung der aufgetauten Zellen. Um die Zelltrümmer vom Virus abzutrennen, wurde die Suspension dreimal zentrifugiert (15 min, 3000 rpm, 4 °C) und jeweils der Überstand abgenommen. Das gewonnene Virus im Überstand wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Auf dieselbe Weise wurde mit nicht-infizierten BJAB-Zellen verfahren. Der erhaltene Überstand wurde ebenfalls in Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren und diente als Mock-Kontrolle bei Experimenten mit Virusinfektion.

3.2.2 Bestimmung des Virustiters

Die Bestimmung des Titers erfolgte über die 50 % Endpunkttitration TCID₅₀ (tissue culture infectious dose 50). Dabei wird die Verdünnungsstufe ermittelt, welche zur Infektion von 50 % der behandelten Zellen ausreicht. Die Feststellung dieser Verdünnung erfolgte mittels B95a-Zellen, welche zunächst in RPMI / 5 % FBS in einer 96-Well-Platte ausgesät (5×10^4 Zellen / Napf) und über Nacht kultiviert wurden. Von

der Viruspräparation wurde eine Virusverdünnungsreihe von 10^{-1} - 10^{-8} in RPMI 1640 erstellt. Pro Verdünnungsstufe wurden je 100 μ l zu 8 Nöpfen der B95a-Zellkultur gegeben. Zur Kontrolle der Zellkultur wurden zusätzlich 8 Nöpfe mit Medium versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde das virushaltige Medium abgesaugt und durch 100 μ l RPMI / 5 % FBS ersetzt. Nach 3 Tagen erfolgte die lichtmikroskopische Untersuchung auf einen CPE in den einzelnen Nöpfen. Die $TCID_{50}$ wurde anschließend über die Formeln nach Spearman und Kärber berechnet (Formel 2, Formel 3).

$$\log TCID_{50} = x_{p=1} + \frac{1}{2} d - d \sum p$$

Formel 2: Bestimmung der 50 % Endpunkttitration. Dabei ist $x_{p=1}$ der dekadische Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe, bei welcher in allen 8 Nöpfen ein CPE detektierbar ist. d: dekadischer Logarithmus des Verdünnungsfaktors. p: Anteil an Nöpfen mit CPE pro Verdünnungsstufe. $\sum p$: Summe aller p ab der Verdünnungsstufe $x_{p=1}$ und den p-Werten aller höheren Verdünnungen mit detektierbarem CPE. Die Berechnung führt zum dekadischen Logarithmus der Verdünnungsstufe, bei der 50 % der Nöpfe einen CPE aufweisen.

$$SE \log TCID_{50} = \sqrt{d^2 \sum p (1 - p) / (n - 1)}$$

Formel 3: Bestimmung des Standardfehlers der $TCID_{50}$. Dabei erfolgte die Benennung der Variablen analog zur Formel 2. d: dekadischer Logarithmus der Verdünnungsstufe. p: Anteil an Nöpfen mit CPE pro Verdünnungsstufe. n: Anzahl der Nöpfe pro Verdünnungsstufe.

3.2.3 Infektion humaner dendritischer Zellen

Die Infektion humaner DCs erfolgte mit einer MOI von 2 an Tag 4 ihrer Kultur. Hierfür wurde die gewünschte Zellzahl der Kultur entnommen, zentrifugiert, in ein kleines Volumen in RPMI / 10 % FBS aufgenommen und mit einer Viruspräparation (MOI 2) versetzt (Endkonzentration: ca. $1,5 \times 10^6$ DCs / ml). Anschließend erfolgte eine Inkubation von 2 h bei 37 °C, während derer die Suspension zur besseren Virusbindung mehrfach gewendet wurde. Die Zellen wurden dann zentrifugiert (5 min, 1200 rpm, RT)

und mit einer Dichte von 6×10^5 in ihr altes Kulturmedium aufgenommen. Es erfolgte die Zugabe von GM-CSF (500 U / ml) und IL-4 (250 U / ml). Danach wurde die Zellkultur mit dem fusionsinhibierenden Peptid (FIP) versetzt (Endkonzentration: 200 μ M).

3.3 RNA-Analytik

3.3.1 Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion

Die Quantifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifizierung eines spezifischen DNA-Segments, des sogenannten Templates, und dient somit dem Nachweis von DNA. Bei einer Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR) bildet die aus Zellen isolierte RNA die Grundlage der Analyse. Diese kann nach Umschreiben in complementary DNA (cDNA) als Template der PCR fungieren. So können semiquantitative Aussagen über den Expressionsstatus von Genen getroffen werden.

Die RT-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um Enzyme des Sphingolipidmetabolismus auf eine Regulation auf RNA-Ebene zu untersuchen, sowie um die erfolgreiche Transfektion von siRNA zu überprüfen.

3.3.1.1 Isolierung von RNA für die cDNA-Synthese

Die RNA-Isolierung aus DCs erfolgte über die Lyse der Zelle mit TRIzol-Reagent, einer monophasischen Lösung aus Phenol, Guanidinisothiozyanat und weiteren Komponenten.

Pro Probe wurden 5×10^5 - 1×10^6 DCs am Tag 5 ihrer Kultur, 24 h nach Behandlung, zentrifugiert (5 min, 1200 rpm, RT), in 1 ml TRIzol-Reagent resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Inkubation der homogenisierten TRIzol-Proben (5 min, RT) wurden jeweils 200 μ l Chloroform zugegeben, die Proben über 15 s geschüttelt und erneut 3 min bei RT inkubiert. Es folgte das Zentrifugieren der Proben (15 min, 13000 rpm, 4 °C), was zur Bildung einer unteren organischen Phase mit DNA und Proteinen, einer Interphase und einer oberen wässrigen Phase mit RNA führte. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß

überführt, welches zuvor zur Erhöhung der RNA-Ausbeute mit Glykogen (10 µg) versehen wurde. Die Präzipitation der RNA erfolgte mit Isopropanol (100 %), wovon 500 µl zur oberen Phase gegeben wurde. Nach Inkubation für 10 min bei RT und Zentrifugieren der Proben (10 min, 13000 rpm, 4 °C) war die RNA in Form eines Pellets am Boden des Gefäßes zu erkennen. Der Überstand wurde abgenommen, die Probe mit 1 ml Ethanol (75 %) gewaschen (5 min, 13000 rpm, 4 °C) und nach Abnahme des Überstands 5 min luftgetrocknet. Die gewonnene RNA wurde anschließend in 25 µl Wasser (HPLC-Grade) resuspendiert und für 10 min bei 55 °C inkubiert. Um die Konzentration zu bestimmen, wurden von der wässrigen RNA-Lösung 2 µl zu 98 µl Wasser (HPLC-Grade) gegeben und mit Hilfe eines Photometers bei 260 nm und 280 nm vermessen.

Zur Überprüfung des Erfolgs einer siRNA-Transfektion wurde die Probengröße auf 4×10^5 DCs verringert.

3.3.1.2 Herstellung von cDNA

Die Synthese von cDNA erfolgt über die reverse Transkription. Dabei wird einzelsträngige RNA über eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit verwendet. Die verwendete Reverse Transkriptase war M-MuLV. Im ersten Schritt wurde eine Mischung mit 11 µl Volumen hergestellt, welche sich aus RNA, Wasser, Oligo(dT)₁₈- und Hexamer-Primern zusammensetzte. Das Volumen der Primer war mit jeweils 1 µl konstant, während von der RNA 2 µg eingesetzt wurden und sich ihr Volumen somit über die zuvor festgestellte Konzentration definierte. Wasser wurde bis zum Erreichen des Gesamtvolumens hinzugefügt. Die nachfolgende Inkubation für 5 min bei 65 °C diente der Denaturierung der RNA und der Primer, sodass im nächsten Schritt die Reverse Transkription initiiert werden konnte. Dafür wurde der Lösung 4 µl RT-Reaktionspuffer, 1 µl Ribonuklease-Inhibitor RiboLock (entspricht 10 Einheiten), 2 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und 2 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (entspricht 10 Einheiten) zugefügt. Es folgten eine Inkubation für 5 min bei RT und eine weitere für 60 min bei 37 °C. In diesem Zeitraum erfolgte die cDNA-Synthese mittels enzymatischer Reverse Transkription.

3.3.1.3 Semiquantitative Bestimmung der cDNA mittels PCR

Um nun eine Aussage über die Expression der gewählten Gene in den DCs treffen zu können, wurden spezifische DNA-Segmente mittels PCR amplifiziert. Die Polymerasekettenreaktion besteht aus 3 Schritten: Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA (Annealing) und Synthese neuer DNA-Doppelstränge (Elongation). Die initiale Denaturierung der cDNA erfolgte über Erhitzen auf 98 °C für 1 min, bei den darauffolgenden Zyklen dauerte dieser Schritt 30 Sekunden. Die anschließende Abkühlung auf 60 °C (30 sek) ermöglichte die Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige DNA (Annealing) und bei 72 °C (30 sec) fand die Synthese neuer DNA durch Polymerase-katalysierten Einbau der Nukleotide statt. Diese 3 Schritte wurden 35-mal wiederholt, wodurch die Menge an DNA exponentiell anstieg. Anschließend wurde die Reaktion über eine Abkühlung auf 4 °C beendet. Die PCR erfolgte mit Hilfe des Phusion High-Fidelity PCR Kits, wobei die gewonnene cDNA bzw. zum Ausschluss einer Verunreinigung in einem Ansatz Wasser (HPLC-Grade) eingesetzt wurde. Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes. DMSO sollte dabei zur Unterstützung der DNA-Denaturierung dienen. Die eingesetzte Polymerase zeichnet sich durch eine hohe Geschwindigkeit der DNA-Synthese und eine sehr geringe Fehlerrate von $4,4 \times 10^{-7}$ aus. Die DNA-Gewinnung erfolgte bei der Untersuchung der Enzyme des Sphingolipidmetabolismus wie auch bei Überprüfung der siRNA-Transfektion auf dieselbe Weise. Allerdings wurden bei Überprüfung der siRNA-Transfektion weitere Ansätze mit verdünnter wässriger cDNA-Lösung (1:2, 1:4) eingesetzt, was das Vergleichen der Expression zwischen Kontrolle und siRNA-Behandlung erleichterte.

3.3.1.4 DNA-Auftrennung mittels Gelelektrophorese und Densitometrie

Eine Gelelektrophorese dient der Auftrennung geladener Moleküle (z.B. DNA-Fragmenten) in einem elektrischen Feld. In der vorliegenden Arbeit wurden Gele mit 2 % Agarose verwendet, welche mit GelRed versetzt wurde. GelRed ist ein in die DNA interkalierender Farbstoff, der in UV-Licht fluoresziert. Je nach Größe des Gels wurde die entsprechende Menge Agarose in 35 ml bzw. 70 ml TAE-Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und der Farbstoff GelRed (0,8 µl bzw. 1,5 µl) zugefügt. Anschließend wurde die Lösung in eine vorbereitete Gelkammer mit eingelegtem Kamm gegeben und innerhalb von 30 min polymerisierte sie bei RT. Die Taschen des

erhärteten Gels wurden mit einem Gemisch aus PCR-Produkt (2 µl) und 6 x Ladepuffer (2 µl) beladen. Außerdem wurden zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente 3 µl eines Markers mit definierten Fragmentgrößen von 100 bp aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einer mit TAE-Puffer befüllten Kammer unter Anlegen eines elektrischen Feldes bei 120 Volt für 1 h - 2 h. Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Kamera aufgenommen.

Die aufgenommenen Bilder wurden semiquantitativ mittels Densitometrie mit der AIDA Software ausgewertet (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, Germany). Die optische Dichte der Banden wurde dabei nach Subtraktion des Hintergrunds berechnet (Abb. 9) und auf die von β -Aktin bezogen. Die berechneten Werte gaben die RNA-Expression der Enzyme in Bezug auf β -Aktin wieder. Diese Indexwerte konnten zwischen verschiedenen behandelten DCs verglichen werden.

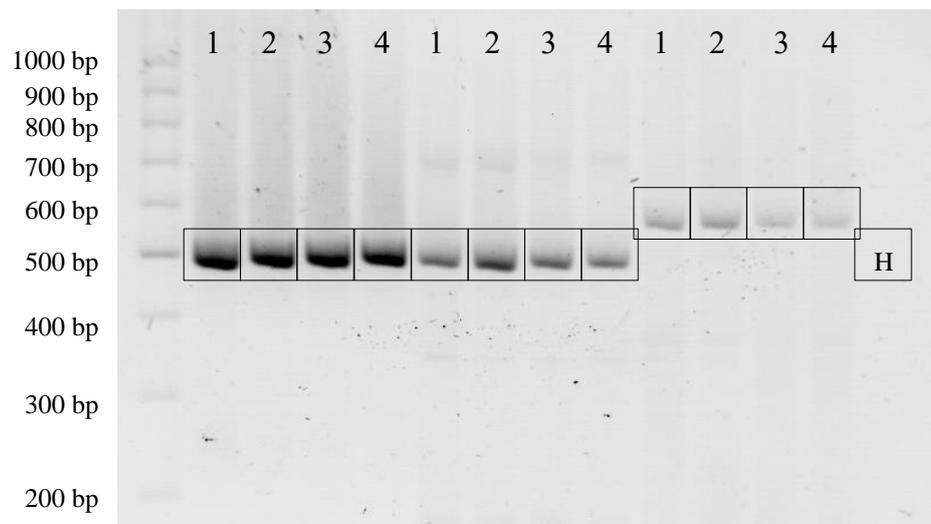


Abbildung 9: Beispiel einer Aufnahme nach Gelelektrophorese. Am linken Rand ist der Marker erkennbar. Die optische Dichte der definierten Kästchen wird ermittelt und anschließend der Hintergrund (H), welcher an der Wasserkontrolle gemessen wird, miteinberechnet. Die ersten 4 Proben stellen Messungen der β -Aktin-Expression dar, auf welche die jeweiligen Enzymexpressionen bezogen werden.

3.3.2 siRNA-Transfektion

Die RNA-Interferenz wird experimentell zur Aufklärung von Genfunktionen verwendet. Dabei werden künstliche small-interfering-RNA (siRNA) in die Zelle eingeschleust. In der vorliegenden Arbeit diente dies zur Reduktion der SphK1 und der SphK2. Dabei wurde zur siRNA-Einschleusung das Reagenz DharmaFECT genutzt, welches zunächst 1:40 in 200 μ l RPMI 1640 verdünnt wurde. Ebenso erfolgte die Lösung von siRNA oder Mission-esiRNA in 200 μ l RPMI 1640 mit einer Konzentration von 2 μ M (siRNA) bzw. 5 ng / μ l (Mission-esiRNA). Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die 2 Lösungen im nächsten Schritt in ein gemeinsames 15-ml-Röhrchen überführt und für 20 min bei RT belassen. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 600 μ l RPMI 1640, sodass ein Gesamtvolumen von 1 ml entstand. Mit diesem Transfektionsmedium konnte ein Ansatz mit 4×10^5 DCs behandelt werden. Die DCs wurden zuvor zentrifugiert (5 min, 1200 rpm, RT), in 1 ml RPMI / 20 % FBS resuspendiert und in einen Napf einer 12-Well-Platte gegeben. Das Transfektionsmedium wurde hinzugefügt, wodurch letztendlich eine Zelldichte von 2×10^5 / ml und eine siRNA-Konzentration von 200 nM bzw. eine Mission-esiRNA-Konzentration von 0,5 ng / μ l vorhanden war. Zudem wurden noch GM-CSF (500 U / ml) und IL-4 (250 U / ml), jedoch keine Antibiotika hinzugefügt. Auf dieselbe Weise wurde auch mit Kontroll (ctrl)-siRNA vorgegangen. Nach einer zweitägigen Kultur bei 37 °C wurden die DCs erneut transfiziert. Der Erfolg der RNA-Interferenz wurde 24 h nach der zweiten Transfektion mittels RT-PCR überprüft, wobei nach der semiquantitativen Auswertung ein Vergleich zwischen SphK1- bzw. SphK1-siRNA- und ctrl-siRNA-transfizierten DCs stattfand.

3.4 Durchflusszytometrie

Über Durchflusszytometrie können physikalische und molekulare Eigenschaften von Partikeln quantitativ erfasst werden. Partikel können dabei Beads, Kunststoffkügelchen oder auch Zellen sein. Bei der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting) werden die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen einzeln durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet. Bei Auftreffen der Lichtstrahlen auf die Zellen kommt es zu einer Lichtstreuung, wobei

das photometrisch detektierte Vorwärtsstreulicht (FSC) Auskunft über die Größe einer Zelle und das Seitwärtsstreulicht (SSC) über deren Granularität gibt. Über Fluoreszenz können zusätzlich Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine analysiert werden. Der monochromatische Laserstrahl regt die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes dabei so an, dass diese ein höheres Energieniveau annehmen und nach dem Laserimpuls die Energie in Form von Licht (Fluoreszenz) wieder emittieren. Die Fluoreszenz wird dann von einem Photodetektor registriert. Sie verhält sich proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Fluorochrome und verfügt über ein für den jeweiligen Farbstoff charakteristisches Emissionsspektrum. Zur Identifizierung und Markierung der Zielstrukturen sind die Fluorochrome an Antikörper gekoppelt. Die verwendeten Antikörper sind in Abschnitt 2.5.3 gemeinsam mit ihrem konjugierten Farbstoff aufgelistet. Die Messungen erfolgten an einem Drei- bzw. Vierfarben-Durchflusszytometer (FACS-Calibur; Becton Dickenson), das über zwei Laser (Anregungswellenlänge: 488 nm und 635 nm) Fluorochrome unterschiedlicher Wellenlänge detektieren kann. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Programme CellQuestPro und Flowjo ausgewertet.

3.4.1 Identifizierung von T-Zellen und dendritischen Zellen

Die Streuung, die beim Auftreffen der Lichtstrahlen entsteht, erfasst physikalische Eigenschaften der Zelle. Dabei ist das Vorwärtsstreulicht (FSC) ein Parameter für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC) einer für die Granularität. Über diese Eigenschaften können bereits Zellpopulationen identifiziert und einem Zelltyp zugeordnet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden auf diese Weise DCs und T-Zellen in Mischpopulation voneinander differenziert (Abb. 10).

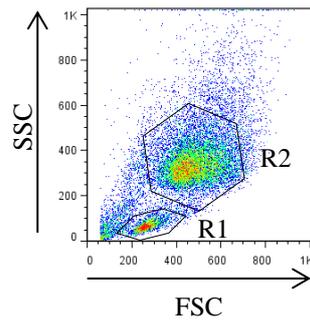


Abbildung 10: Gating von DCs und T-Zellen mittels FSC und SSC. Aufgrund ihrer kleinen Zellgröße und geringen Granularität sind T-Zellen in Region 1 (R1) zu lokalisieren, während Region 2 (R2) eine Population von DCs widerspiegelt. Bei Untersuchungen der einzelnen Zelltypen in Mischpopulationen wurde die Lage des Gates für T-Zellen und für DCs auf diese Weise ausgewählt.

3.4.2 Bestimmung zellulärer Oberflächenmoleküle

Zur Analyse von Oberflächenmolekülen der DCs und T-Zellen wurden pro Färbung 1×10^5 - 2×10^5 Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (5 min, 1200 rpm, RT) und anschließend in 50 μ l der Antikörperlösung resuspendiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper zur Oberflächenfärbung waren bereits Fluorochrom-gekoppelt und wurden, bis auf den Antikörper zur S1P₁-Markierung, 1:50 in FACS-Puffer verdünnt. Der S1P₁-Antikörper wurde 1:20 in FACS-Puffer gelöst. Unter Lichtausschluss inkubierten die Zellen in dieser Lösung für 30 min bei 4 °C. Daraufhin erfolgte eine erneute Waschung mit 1 ml FACS-Puffer (5 min, 1200 rpm, RT). Dadurch wurde überschüssiger Antikörper entfernt, sodass bei der folgenden FACS-Analyse lediglich gebundener Antikörper detektiert wurden. Für die Analyse wurde das Pellet in 130 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Zu jeder Antikörperfärbung wurde für den jeweiligen Zelltyp eine passende Färbung mit Isotyp-Antikörper durchgeführt. Ein Isotyp-Antikörper besitzt dieselbe F_c-Domäne und dasselbe Fluorochrom wie seine Referenz. Er dient jedoch nicht der Detektion von Oberflächenproteinen, sondern der Abschätzung unspezifischer Bindung über F_c-Rezeptoren, der Interaktion mit zellulären Proteinen und der Autofluoreszenz der Zellen.

3.4.3 Bestimmung der Infektionsrate

Zur Feststellung einer erfolgreichen MV-Infektion von DCs diente die durchflusszytometrische Messung des intrazellulär gebildeten viralen N-Proteins. Auch hierfür wurden zunächst 1×10^5 - 2×10^5 DCs in 1 ml FACS-Puffer gewaschen (5 min, 1200 rpm, RT), dann aber mit 100 μ l einer Paraformaldehydlösung (2 %) für 20 min auf Eis fixiert. Anschließend erfolgten 2 weitere Waschschrte mit jeweils 1 ml Saponinpuffer (5 min, 1200 rpm, RT) und die Inkubation für 45 min bei RT in 50 μ l einer N-Protein-Antikörper-Saponinlösung (1:50). Nachfolgend wurden die Zellen gewaschen und mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper (1:100 in 50 μ l Saponin verdünnt) für 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Vor Analyse der Proben wurden sie nochmals mit Saponinpuffer gewaschen und in 130 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Als Kontrolle zur Messung unspezifischer Fluoreszenz wurden unbehandelte und Mock-behandelten DCs ebenfalls gefärbt. Somit konnte bei Detektion einer im Vergleich zu diesen Proben höheren Fluoreszenzintensität (N-Protein-positiv) von einer Infektion der Zelle ausgegangen werden. Die Infektionsrate wurde als der Anteil MV-infizierter DCs an der gesamten DC-Population definiert.

3.4.4 Zellviabilität

Um die Wirkung verschiedener Inhibitoren auf die Zellviabilität von DCs und T-Zellen zu beurteilen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) genutzt. Dieser markiert spät-apoptotische und nekrotische Zellen, da diese aufgrund zerstörter Integrität ihrer Zellmembran permeabel für PI sind. PI interkaliert in ihre DNA und kann durchflusszytometrisch detektiert werden. Zur Überprüfung wurden 2×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt, zweimal mit 1 ml PBS gewaschen (5 min, 1200 rpm, RT), mit 40 μ l einer PI-Verdünnung (1:20 in FACS-Puffer) versetzt und 15 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 100 μ l FACS-Puffer erfolgte die Messung am Durchflusszytometer. Der Anteil PI-positiver Zellen zeigte dabei die Zytotoxizität der Substanz auf.

3.4.5 CFSE-Labeling von T-Zellen

Wie in Abschnitt 3.7.1 beschrieben wird, wurden zur Untersuchung einer Chemotaxis T-Zellen ins obere Kompartiment des Transwell-Assays eingesetzt. Die Migration fand in Richtung des unteren Kompartiments statt. Bei T-Zellchemotaxis in Antwort auf DCs befanden sich im unteren Kompartiment bereits vereinzelt T-Zellen, welche der angereicherten DC-Kultur entstammten. Um eine Diskriminierung zwischen den T-Zellen unterschiedlichen Ursprungs vorzunehmen, erfolgte 24 h vor Experiment ein Labeling der auf Migration zu untersuchenden T-Zellen mit Carboxyfluorescein-(5-, 6-)diacetat (CFSE). CFSE diffundiert passiv in die Zellen und wird dort durch Esterasen zu einem fluoreszierenden Ester verarbeitet, der mit intrazellulären Aminen zu stabilen Konjugaten reagiert und durchflusszytometrisch detektiert werden kann. Für diese Färbung wurde pro 1×10^7 T-Zellen 1 ml CFSE-Lösung (2,5 μ M in PBS) verwendet. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 1200 rpm, RT), in der CFSE-Lösung resuspendiert und zur Verteilung des Farbstoffes möglichst zeitnah durchmischt. Nach einer Inkubation für 5 min bei RT wurde die Probe dreimal mit 10 ml PBS / 5 % FBS gewaschen (5 min, 1200 rpm, RT) und unter adäquaten Bedingungen kultiviert (siehe Abschnitt 3.1.8).

3.4.6 Quantitative Messung der migrierten T-Zellen mittels Counterbeads

Um die absolute Anzahl an Zellen einer FACS-Probe zu bestimmen, wurden Counterbeads eingesetzt. Diese Mikrokügelchen können über ihre Größe und Granularität durchflusszytometrisch eindeutig identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode verwendet, um die Anzahl an migrierten CFSE-gelabelten T-Zellen beim Transwell-Assay zu detektieren. Dabei wurden diese aus dem unteren Kompartiment in ein FACS-Röhrchen überführt und Counterbeads einer bekannten Menge (2×10^4) hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe zur gleichmäßigen Verteilung der Counterbeads gut durchmischt und mit mittlerer Geschwindigkeit über 2 min durchflusszytometrisch gemessen. Zur Auswertung der Daten wurden 2 Regionen über SSC und FSC definiert. Region 1 beinhaltete die Counterbeads, Region 2 die T-Zellen. Region 2 wurde nochmals anhand der Fluoreszenz des CFSE-Labels geteilt, wodurch migrierte von im unteren Kompartiment bereits vorhandenen T-Zellen differenziert werden konnten. In der so entstandenen Region 3 befanden sich nun die

migrierten CFSE-positiven T-Zellen. In Abbildung 11 ist der Vorgang dargestellt. Über die Zahl der gemessenen Ereignisse in Region 1 (Counterbeads), die Zahl der gemessenen Ereignisse in Region 3 (migrierte T-Zellen) und die bekannte Anzahl an Counterbeads in der Probe konnte mit Hilfe der Formel 4 die Gesamtheit der migrierten T-Zellen erfasst werden.

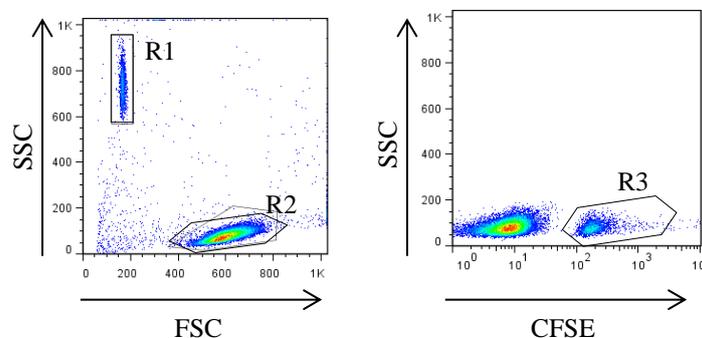


Abbildung 11: Festlegung der Regionen bei quantitativer Durchflusszytometrie. Über SSC und FSC wurden Counterbeads (R1) von T-Zellen (R2) differenziert. Die T-Zellen wurden mittels CFSE als migrierte (CFSE-positiv: R3) und im Kompartiment bereits vorhandene T-Zellen (CFSE-negativ) identifiziert.

$$\begin{aligned} \text{Anzahl migrierter T-Zellen} = & \\ & (\text{gezählte Ereignisse in R3} / \text{gezählte Ereignisse in R1}) \\ & \times \\ & \text{Anzahl der eingesetzten Counterbeads} \end{aligned}$$

Formel 4: Berechnung der absoluten Anzahl an migrierten T-Zellen in einer Probe.

3.5 Intrazelluläre Sphingolipidanalyse

Die intrazellulären Lipidanalysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. B. Kleuser und Prof. Dr. L. Japtok an der Universität Potsdam. Zur Vorbereitung wurden DCs nach Behandlung an Tag 5 ihrer Kultur zentrifugiert (5 min, 1200 rpm, RT). Das Zellpellet wurde nach Zugabe von 1 ml Methanol bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Als Behandlung erfolgten an Tag 4 die Induktion der Ausreifung (Abschnitt 3.1.7) und die Zugabe von Mock und Masernvirus (Abschnitt 3.2.3). Kontrollzellen wurden unbehandelt belassen. Abbildung 12 zeigt das Vorgehen graphisch. Der Lipidgehalt wurde dann an der Universität Potsdam über Kopplung von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie (Q-Tof LC / MS) gemessen.

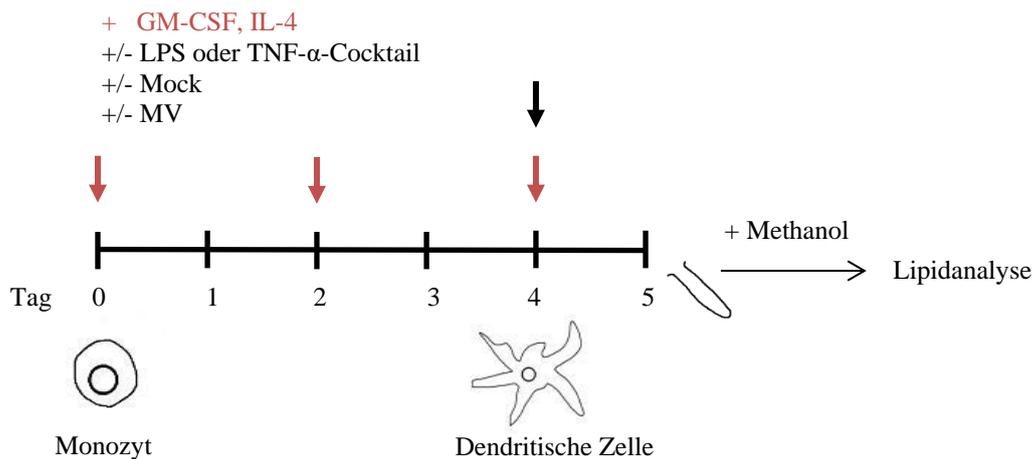


Abbildung 12: Probenpräparation zur Sphingolipidanalyse. DCs wurden aus Monozyten über Zugabe von Differenzierungsfaktoren (rote Pfeile) generiert und nach 4 Tagen verschiedenen Behandlungen ausgesetzt (schwarzer Pfeil). 24 Stunden später wurde der Erfolg der Behandlung durchflusszytometrisch (FACS-Analyse) kontrolliert. Nach Aufnahme der Zellen in Methanol erfolgte die Lipidanalyse mittels Q-Tof LC / MS.

3.6 Messung der Sphingomyelinase-Aktivität

6-Hexadecanoylamino-4-methylumbelliferylphosphorylcholin (HMU-PC) ist ein spezifisches Substrat für Sphingomyelinasen. Die enzymatische Reaktion führt dabei zur Hydrolyse des Substrats und dadurch zum Freiwerden des fluoreszierenden HMU. Mit Hilfe eines Fluorimeters wird der Farbstoff mit einer spezifischen Strahlung (404 nm) angeregt und dessen Emissionswellenlänge (460 nm) detektiert. Dadurch kann das von Sphingomyelinasen gespaltene Substrat erfasst werden. Die gemessene Fluoreszenz verhält sich dabei proportional zum umgesetzten Substrat und damit zur Aktivität der Sphingomyelinasen. HMU-PC bildet deshalb die Grundlage des ASM- bzw. NSM-Assays, mittels welchem in dieser Arbeit die Aktivität der Sphingomyelinasen in iDCs, mDCs, Mock-behandelten und MV-infizierten DCs untersucht wurde. Hierfür wurden zunächst 3×10^5 Zellen nach Zugabe von 1 ml kaltem PBS zentrifugiert (1 min, 8000 rpm, RT) und in 40 μ l Lysis-Puffer resuspendiert. Wie Tabelle 6 zeigt, war die Zusammensetzung dabei abhängig vom zu analysierenden Isoenzym (ASM / NSM). Anschließend wurden die Zellen bei -80°C eingefroren, aufgetaut und durchmischt. Nach dreifacher Wiederholung dieser Schritte wurde das Lysat zur Abtrennung von Zellkernen zentrifugiert (15 sek, 8000 rpm, RT) und der Überstand zur Aktivitätsmessung verwendet. Wie in Tabelle 8 zu sehen ist, unterschieden sich die Reaktionsansätze vor allem im pH-Wert, welcher nach dem Optimum des jeweiligen Enzyms gewählt wurde. Daneben konnte durch die Beigabe von Phosphaten (ATP) bei der Analyse der NSM eine hemmende Wirkung auf die ASM ausgeübt und so die Spezifität der Messung erhöht werden. Die Proben wurden für 17 h bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit konnte die enzymatische Spaltung des Substrats stattfinden, was über die Zugabe von 200 μ l Stopp-Puffer beendet wurde. Die Proben wurden durchmischt, in eine schwarze 96-Well-Platte überführt und am Fluorimeter mit oben genannten Wellenlängen vermessen. Um Fehler zu minimieren, wurden pro Probe 3 identische Reaktionsansätze untersucht, deren Fluoreszenzintensitäten zu einem Mittelwert zusammengefasst wurden. Zudem wurde über die Messung einer zellfreien Kontrolle die Fluoreszenz des Hintergrunds identifiziert und in die Berechnungen einbezogen.

3.7 Untersuchungen zur T-Zellchemotaxis

3.7.1 Transwell-Assay

Um T-Zellchemotaxis quantitativ erfassen zu können, wurde ein Filtersystem gewählt. Dabei erfolgte über einen Filter definierter Porengröße die Generierung zweier Kompartimente in einer 24-Well-Platte. Der Filter fungierte als Barriere zwischen T-Zellen im oberen Kompartiment und Chemoattraktant im unteren. Die Porengröße variierte dabei je nach Zelltyp. Während bei Jurkat-T-Zellen Poren von 8 μm eingesetzt wurden, waren es bei primären humane T-Zellen 5 μm . Die T-Zellchemotaxis erfolgte in Antwort auf SDF-1 α (1 μg / ml in 600 μl Migrationsmedium) oder auf allogene DCs. Um letzteres zu überprüfen, wurden 6×10^5 DCs mit 5 ml Migrationsmedium gewaschen (5 min, 1200 rpm, RT), in 600 μl desselben aufgenommen und für 2 h bei 37 °C im unteren Kompartiment präinkubiert (1 $\times 10^6$ DCs / ml). Diese Zeit sollte den DCs zur Produktion und Sekretion von Chemokinen dienen. Bei Experimenten mit mDCs oder MV-infizierten DCs erfolgte die Behandlung 24 h vor Transwell-Assay. Zur Erfassung der ungerichteten Spontanmigration wurde außerdem eine Kontrolle, welche lediglich Migrationsmedium im unteren Kompartiment enthielt, untersucht. Die induzierte T-Zellchemotaxis wurde in Bezug auf die ungerichtete Spontanmigration interpretiert. Dabei wurde ein Migrationsindex definiert, welcher das Verhältnis zwischen induzierter und spontaner Migration darstellte. Die T-Zellchemotaxis wurde anhand von 1×10^6 primären humanen T-Zellen bzw. 6×10^5 Jurkat-T-Zellen beurteilt. Diese wurden am Tag vor dem Transwell-Assay isoliert, mit CFSE markiert und kultiviert. Dabei erfolgte die Kultur primärer T-Zellen, mit Ausnahme der Experimente zum Medienvergleich, in serumfreiem X-Vivo. Nach Zentrifugieren (5 min, 1200 rpm, RT) wurden die Zellen in 100 μl des Migrationsmediums resuspendiert und erreichten damit eine Zelldichte von 1×10^7 / ml (primäre T-Zellen) bzw. 6×10^6 / ml (Jurkat-T-Zellen). Vor dem Einsetzen der Zellen ins obere Kompartiment, wurde der Filter in 200 μl des Migrationsmediums 30 min lang bei 37 °C äquilibriert. Der Transwell-Assay inkubierte anschließend für 3 h bei 37 °C. Daraufhin wurde der Filter vorsichtig dreimal am Rand des Napfes abgeklopft und entfernt. Um die migrierten T-Zellen zu quantifizieren, wurde die Zellsuspension des unteren Kompartiments in FACS-Röhrchen überführt und die Anzahl der migrierten T-Zellen mit Hilfe von

quantitativen Durchflusszytometrie ermittelt. Abbildung 13 stellt die beschriebene Methode graphisch dar.

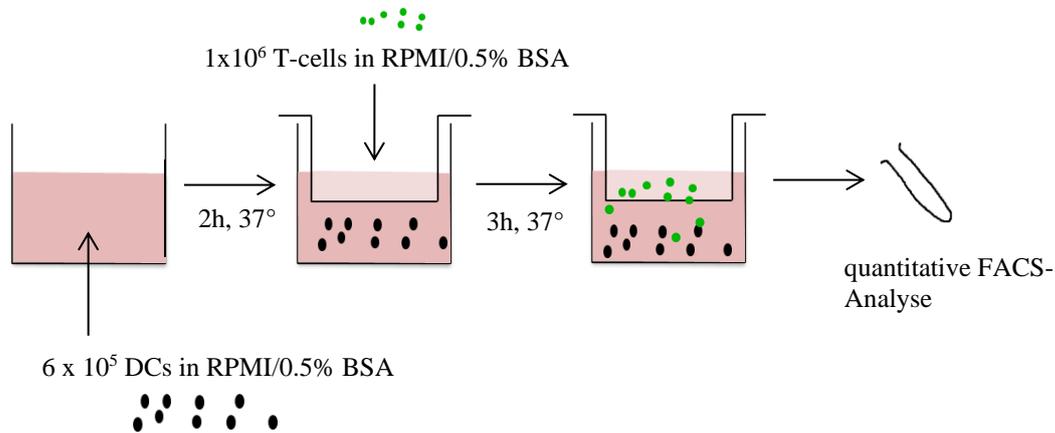


Abbildung 13: Methodisches Vorgehen beim Transwell Assays primärer humaner T Zellen in Antwort auf DCs.

3.7.2 Chemotaxis-Assay im zweidimensionalen System

Qualitative Aussagen über die T-Zellchemotaxis können beim Beobachten der Zellen getroffen werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von Untersuchungen im zweidimensionalen System ermöglicht. Dabei erfolgte die T-Zellmigration in Antwort auf SDF-1 α und allogene mDCs. Verglichen wurden diese Daten mit ungerichteter Spontanmigration, welche analog zum Transwell-Assay erfasst wurde. Zur Vorbereitung wurde ein Channelslide (μ -Slide VI^{0.4}) in $100\ \mu\text{l}$ des Migrationsmedium für $30\ \text{min}$ bei $37\ ^\circ\text{C}$ äquilibriert und anschließend mit $30\ \mu\text{l}$ desselben befüllt. 5×10^5 DCs und 1×10^6 primäre humane T-Zellen wurden zentrifugiert ($5\ \text{min}$, $1200\ \text{rpm}$, RT), in jeweils $100\ \mu\text{l}$ des Migrationsmediums resuspendiert und für $1\ \text{h}$ bei $37\ ^\circ\text{C}$ präinkubiert. Beim Ansetzen des Chemotaxis-Assays, wurden $30\ \mu\text{l}$ der vorbereiteten Zellsuspensionen bzw. einer SDF-1 α -Lösung ($1,5\ \mu\text{g} / \text{ml}$) in gegenüberliegende Näpfe gegeben, sodass die T-Zellen über einen Kanal vom Chemoattraktant getrennt lagen. Nach einer Inkubation von $1\ \text{h}$ bei $37\ ^\circ\text{C}$ wurden die Zellen mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (LSM 780) bei 20-facher Vergrößerung beobachtet. Auch hier war durch einen Inkubator eine Temperatur von $37\ ^\circ\text{C}$ gewährleistet. Über einen Zeitraum von $3\ \text{h}$ erfolgte jede Minute

die Aufnahme eines Bildes. Mit Hilfe der Software ImageJ konnten die T-Zellen über die Bilderserie manuell verfolgt und auf ihre Migrationsqualitäten untersucht werden.

3.8 Statistik

Sämtliche Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Software GraphPad Prism. Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) angegeben. Die Prüfung auf Signifikanz erfolgte über die im Folgenden genannten Tests. Dabei spielten die Normverteilung und die Verbundenheit der Messdaten eine Rolle. Aufgrund der Tatsache, dass innerhalb eines Experiments die Zellen eines Spenders in verschiedenen Bedingungen miteinander verglichen wurden, wurden verbundene Messdaten angenommen. Bei positiver Prüfung auf eine Gauß-Verteilung der Daten (D'Agostino-Pearson-Test) wurde der Students t-Test bzw. die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) angewendet. Bei ausgeschlossener Normverteilung ermittelte sich der p-Wert anhand des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests bzw. des Friedman-Tests. Bei unverbundenen Messdaten wurde in diesem Fall der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Außerdem erfolgte bei Mehrfachvergleichen die Dunn-Sidak-Korrektur. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (* $p < 0,05$) akzeptiert. Als sehr signifikant galten Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 1 % (** $p < 0,01$) und als hoch signifikant Ergebnisse mit unter 0,1 % (***) $p < 0,001$).

4. Ergebnisse

4.1 Quantifizierung von S1P in DCs

Um mögliche funktionelle Auswirkungen von Veränderungen im S1P-Haushalt dendritischer Zellen untersuchen zu können, wurde zunächst S1P quantitativ in humanen DCs bestimmt. Hierfür wurden Zellen von 8 Spenderinnen und Spendern verwendet und jeweils Lipidanalysen unbehandelter iDCs, mDCs, Mock-behandelter und MV-infizierter DCs durchgeführt. Die Bestimmung des S1Ps erfolgte über die Messung der Spaltprodukte der S1P-Lyase und deren Metaboliten mittels Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (Q-ToF LC / MS). Parallel zur Lipidanalyse erfolgte eine durchflusszytometrische Charakterisierung der DCs.

4.1.1 S1P und Sphingosin in iDCs im Vergleich zu Erythrozyten

Um eine bessere Interpretation der S1P-Messungen zu ermöglichen, wurden neben DCs auch Erythrozyten (ein als Hauptquelle für S1P bekannter Zelltyp) direkt nach Dichtegradientenzentrifugation analysiert und zusätzlich der Vorläufer Sphingosin bestimmt. Die Lipidanalyse erfolgte für beide Sphingolipide an zellulärem Material aus jeweils 20 Millionen Erythrozyten bzw. jeweils 1 Million iDCs.

Im Durchschnitt waren in einer Probe von 20 Millionen Erythrozyten $5,68 \pm 1,14$ pmol und in 1 Million iDCs $3,00 \pm 1,32$ pmol S1P enthalten. Die Sphingosinwerte in 20 Millionen Erythrozyten erreichten $0,12 \pm 0,04$ pmol und 1 Million iDCs $3,34 \pm 1,18$ pmol. Unter der Annahme einer linearen Korrelation zwischen Zellzahl und Lipidmenge wurden die S1P- bzw. Sphingosinwerte einer Anzahl von 1 Million iDCs und Erythrozyten verglichen (Abb. 14). Danach konnten in iDCs etwa 10,5-fach höhere S1P-Mengen nachgewiesen werden als in Erythrozyten. Für dessen Vorläufer Sphingosin war eine noch größere Differenz zwischen den Zelltypen vorhanden. Hinsichtlich des Sphingosins übertrafen iDCs Erythrozyten um ein über 500-faches. Wurde nun S1P und dessen Vorläufer Sphingosin innerhalb eines Zelltyps gegenübergestellt, konnten in iDCs die Lipide in einer vergleichbaren Größenordnung

nachgewiesen werden, während in Erythrozyten die Werte von S1P 50-fach über den Werten von Sphingosin lagen.

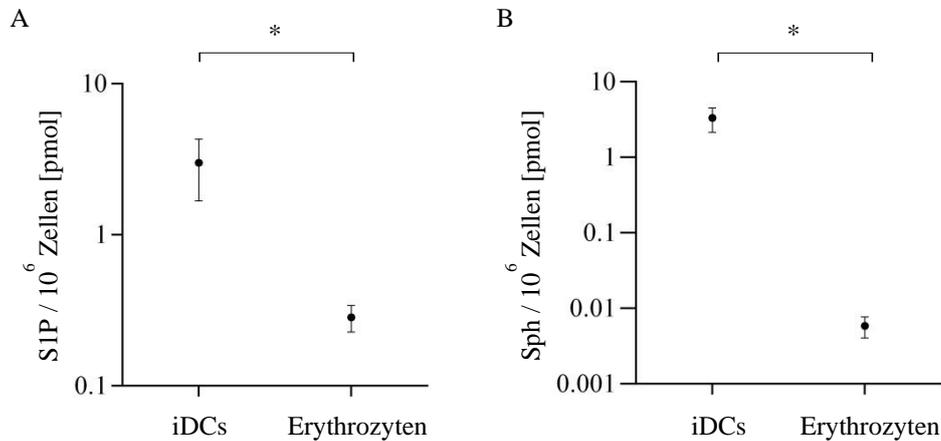


Abbildung 14: S1P- und Sphingosin-Analyse in iDCs und Erythrozyten. Zur Probengewinnung von DCs wurde wie in Abschnitt 3.5 vorgegangen. Erythrozyten wurden zu 2×10^7 Zellen direkt nach Isolation in Methanol aufgenommen. Die Lipidanalyse beinhaltete die Messung von S1P (A) sowie Sphingosin (B). Die Werte repräsentieren Mittelwerte aus jeweils 8 Proben.

4.1.2 Einfluss verschiedener Ausreifungsprotokolle auf S1P in DCs

Im Folgenden wurde die Frage untersucht, ob die durch eine Ausreifung bedingten strukturellen und funktionellen Veränderungen dendritischer Zellen den S1P-Gehalt beeinflussen. Um dabei einen möglichen Einfluss des Ausreifungsprotokolls zu erfassen, wurden 2 unterschiedliche Protokolle gewählt. Protokoll 1 (P 1) nutzte LPS als Stimulus, Protokoll 2 (P 2) TNF- α zusammen mit PGE₂, IL-1 β und IL-6 β .

Die phänotypische Ausreifung wurde durchflusszytometrisch anhand des Reifungsmarkers CD86 überprüft, was in Abbildung 15 exemplarisch für unbehandelte und behandelte DCs einer Probe dargestellt ist. 24 Stunden nach Zugabe der Ausreifungsstimuli war die Expression von CD86 im Vergleich zu iDCs für beide Protokolle gleichermaßen erhöht ($83,1 \pm 8\%$ versus $22,5 \pm 8\%$ ($p < 0,01$)). Diese Veränderungen waren auch bei Betrachtung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI)

zu erkennen. Auch hier erfolgte die Verschiebung zu einer höheren MFI unabhängig vom Protokoll.

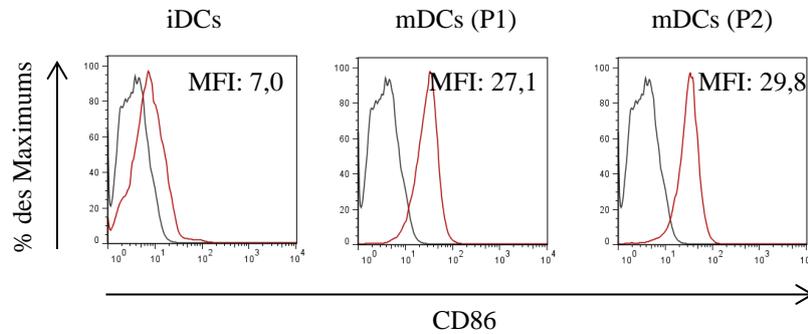


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse von DCs nach Ausreifung. Zellen wurden 24 h nach Behandlung mit einem CD86-Antikörper gefärbt (rote Linie). Als CD86-positiv galten Zellen, die höhere Intensitäten als der Isotyp (graue Linie) aufwiesen. Die Ausreifung erfolgte mittels P1 (LPS) oder P2 (TNF- α + PGE₂ + IL-1 β + IL-6 β). Dargestellt sind die Histogramme einer repräsentativen Probe. Die MFI-Werte entsprechen dem geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität.

Auch die S1P-Werte wurden durch die Ausreifung der DCs beeinflusst. Die Menge an S1P reduzierte sich bezogen auf iDCs bei allen Proben deutlich und lag im Mittel nur noch bei $43,8 \pm 10,5$ %, was $1,21 \pm 0,36$ pmol S1P pro 1 Million mDCs entsprach ($p < 0,01$). Wie aus Abbildung 16 hervorgeht, hatte auch hier die Wahl des Ausreifungsprotokolls keinen Einfluss auf das Ausmaß der Reduktion. Demnach beeinflusste der Ausreifungsprozess unabhängig vom Protokoll den S1P-Gehalt ebenso wie die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle.

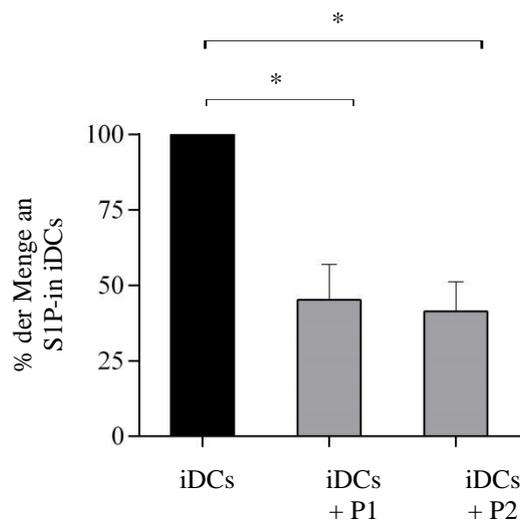


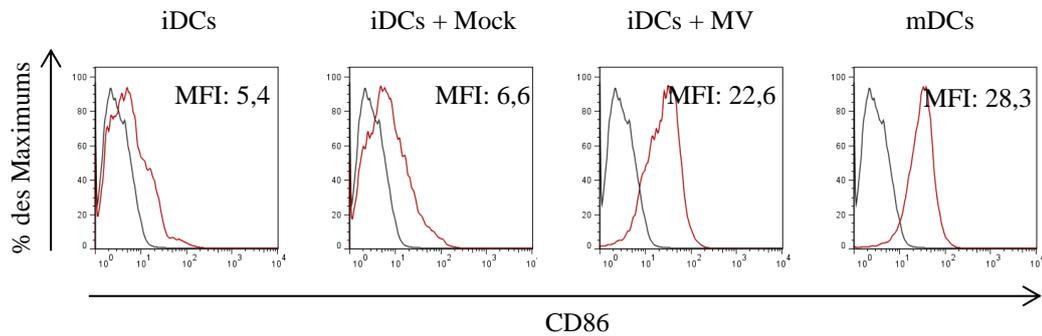
Abbildung 16: S1P-Analyse in DCs nach Ausreifung. Zur Probengewinnung von DCs wurde wie in Abschnitt 3.5 vorgegangen. Dabei erfolgte die Ausreifung mittels P1 oder P2. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung zur Menge in iDCs. * $p < 0,05$.

4.1.3 S1P in MV-infizierten DCs

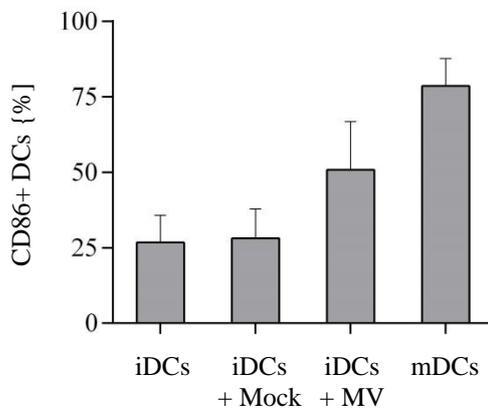
Zur Charakterisierung des S1P-Gehaltes MV-infizierter Zellen wurde dieselbe Anzahl an iDCs einer Probe mit LPS oder TNF- α , einer Virus- (MOI 2) bzw. Mockpräparation versetzt. Dies ermöglichte einen direkten Vergleich des Effektes einer MV-Infektion auf den S1P-Gehalt und den Reifungsmarker CD86 mit dem einer Ausreifung nach den bereits aufgeführten Protokollen.

Die Anzahl CD86-positiver Zellen war mit $22,5 \pm 8,0$ % bzw. $24,0 \pm 8,5$ % bei un- bzw. Mock-behandelten iDCs am geringsten (Abb. 17). 24 Stunden nach MV-Infektion stieg die Anzahl deutlich an ($54,4 \pm 13,8$ %), jedoch weniger als nach LPS- oder TNF- α -Ausreifung ($83,1 \pm 8,0$ %). Diese Veränderungen zeigten sich auch in der MFI. Die Infektionsrate erstreckte sich von 19,8 % bis 78,0 %. Sowohl niedrig (< 50 % N-Protein-positive DCs) als auch hoch infizierte DCs (≥ 50 % N-Protein-positive DCs) zeigten die vermehrte, jedoch unter der Messung für mDCs gelegene CD86-Oberflächenexpression ohne Korrelation mit dem Ausmaß der Infektion ($p = 0,4$).

A



B



C

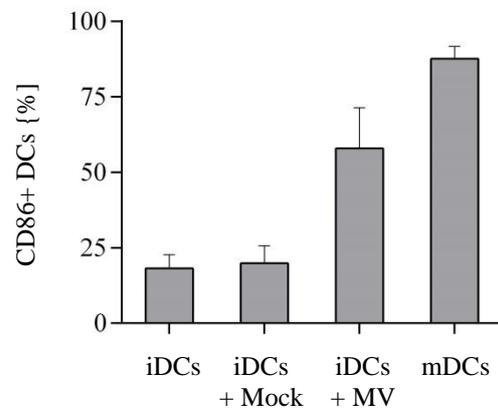
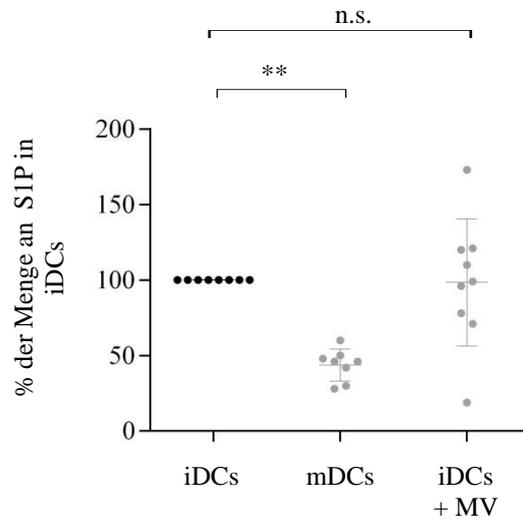


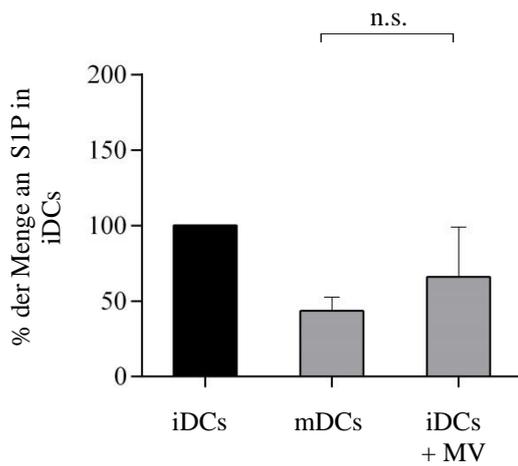
Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse von DCs. Zellen wurden 24 h nach Mock-Behandlung, MV-Infektion (MOI 2), Ausreifung, und unbehandelt mit einem CD86-Antikörper gefärbt (rote Linie). Als CD86-positiv galten Zellen, die höhere Intensitäten als der Isotyp (graue Linie) aufwiesen. Dargestellt sind die Histogramme einer repräsentativen Probe mit Angabe der MFI, die dem geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität entspricht (A). Die Infektionsrate wurde mittels Messung des viralen N-Proteins ermittelt und die CD86-positiven Zellen in Abhängigkeit zu dieser abgebildet. Dabei wurde zwischen niedriger (B) und hoher (C) Infektionsrate unterschieden.

Eine MV-Infektion beeinflusste den S1P-Gehalt in DCs in unterschiedlicher Weise (Abb. 18). So wurden verglichen mit Mock-behandelten iDCs Veränderungen sowohl zu höheren Werten (bis zu 173 %) als auch zu niedrigeren Werten (bis zu 19 %) gemessen. Diese Modulationen korrelierten mit der Infektionsrate. Der S1P-Gehalt unterschied sich in niedrig infizierten Zell-Kulturen nicht signifikant von den in mDCs gemessenen Werten ($p > 0,99$). Im Gegensatz dazu war der S1P-Gehalt in hoch infizierten Kulturen höher als in mDCs ($p < 0,05$), ähnelte den für iDCs ermittelten Werten und betrug bezogen auf diese im Mittel $125,5 \pm 32,8$ %.

A



B



C

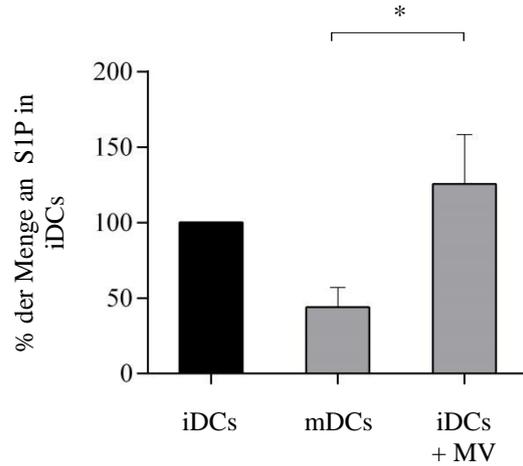


Abbildung 18: S1P - Analyse in DCs nach Ausreifung und MV-Infektion. Zur Probengewinnung der DCs wurde wie in Abb. 12 vorgegangen. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung zur Menge in iDCs, wobei bei mDCs unbehandelte iDCs und bei MV-infizierten DCs Mock-behandelte iDCs als Referenz dienten (A). Die Einteilung in niedrig infizierte (B) und hoch infizierte DCs (C) erfolgte durchflusszytometrisch anhand N-Protein-positiver DCs. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

4.1.4 Oberflächenexpression des S1P₁-Rezeptors in DCs nach Ausreifung und MV-Infektion

Die Oberflächenexpression des S1P₁-Rezeptors wurde vergleichend in un- und Mock-behandelten, LPS-ausgereiften und MV-infizierten DCs 24 Stunden nach der jeweiligen Behandlung durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 19 stellt die Ergebnisse dar. Der prozentuale Anteil S1P₁-positiver Zellen betrug für iDCs im Mittel $45,2 \pm 14,8$ % und verdoppelte sich nach Ausreifung auf $87,3 \pm 7,1$ %, während eine MV-Infektion keine signifikante Veränderung zu Mock-behandelten iDCs hervorrief. Die MFI wies dieselben Tendenzen auf. Damit zeigen sich auch hier Unterschiede zwischen MV-infizierten DCs und mDCs.

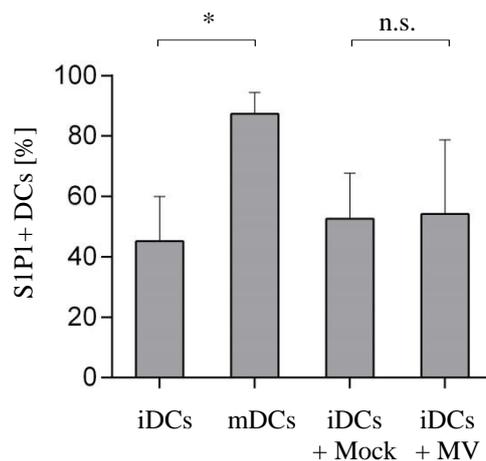


Abbildung 19: S1P₁-Oberflächenexpression in DCs nach Ausreifung und MV-Infektion. DCs wurden 24 h nach Mock-Behandlung, MV-Infektion, LPS-Ausreifung, sowie unbehandelt mit einem S1P₁-Antikörper gefärbt. Als S1P₁-positiv galten Zellen, die höhere Intensitäten als bei Färbung mit Isotyp-Antikörper aufwiesen (A). n = 4. *p < 0,05.

4.2 Sphingolipid-Metabolismus dendritischer Zellen

Da die in Abschnitt 4.1 detektierten Veränderungen des S1P-Levels in DCs über verschiedene Mechanismen entstehen konnten, wurden im Folgenden die einzelnen Enzyme des Sphingolipidmetabolismus näher untersucht.

4.2.1 Sphingomyelinase-Aktivität dendritischer Zellen nach Ausreifung und MV-Infektion

Aufgrund vorheriger Experimente der Arbeitsgruppe, die nach MV-Kontakt mit DCs eine Aktivierung von Sphingomyelinasen innerhalb von 3-15 Minuten belegten, wurde nun deren Aktivierung 24 h nach Stimulation bzw. Infektion mit iDCs bzw. Mock-behandelten iDCs verglichen. Die Messung der Aktivität erfolgte je nach Isoenzym mittels ASM- bzw. NSM-Assay, indem die Akkumulation des fluoreszierenden Spaltproduktes bestimmt wurde.

Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, zeigte sich zum genannten Zeitpunkt weder nach Ausreifung noch nach MV-Infektion der DCs eine signifikante Veränderung der Aktivität der Sphingomyelinasen ($p = 0,07$). Dies traf sowohl auf die ASM als auch auf die NSM zu. Damit lag nahe, dass die Unterschiede im S1P-Gehalt dendritischer Zellen durch Enzyme im weiteren Verlauf des S1P-Metabolismus bedingt waren.

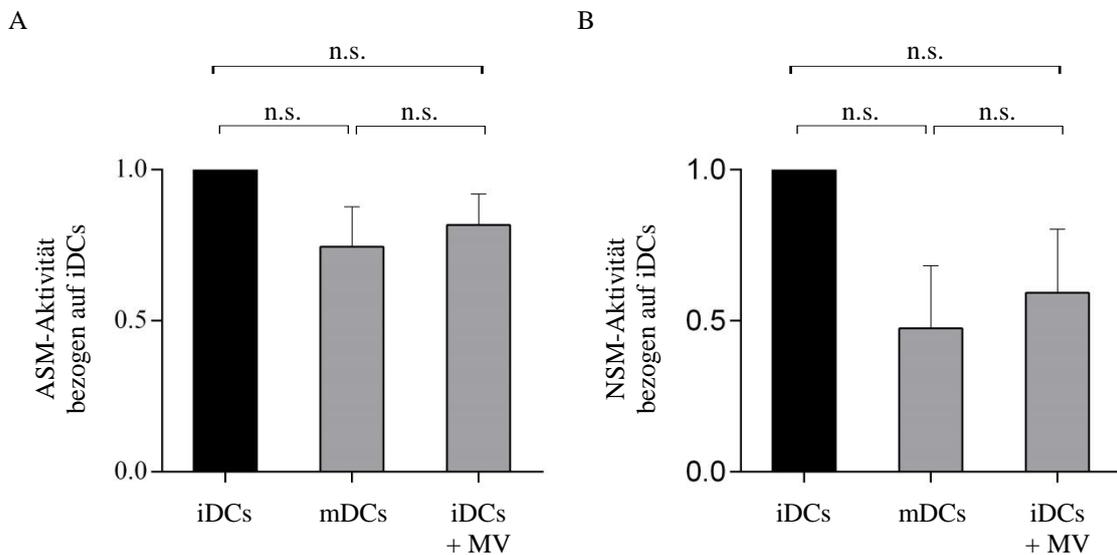


Abbildung 20: ASM- und NSM-Aktivität nach Ausreifung und MV-Infektion von DCs. Zellen wurden 24 h vor Experiment ausgereift, mit Mock behandelt und mit MV infiziert. Die Aktivitätsmessung erfolgte im ASM- bzw. NSM-Assay mittels fluorimetrischer Messung des Spaltproduktes des Substrats. Dargestellt ist die ASM- (A) und NSM-Aktivität (B) bezogen auf die Aktivität in iDCs bei mDCs bzw. Mock-behandelten iDCs bei MV-infizierten DCs. $n = 4$.

4.2.2 Bestimmung von Zwischenprodukten der S1P-Synthese in DCs nach Ausreifung und MV-Infektion

Um herauszufinden, welche Enzyme an der Regulation des S1P-Gehalts in DCs involviert sein könnten, erfolgte eine Quantifizierung verschiedener Zwischenprodukte des Sphingolipid-Metabolismus. Hierzu wurden 3 Proben analog zu vorherigen Experimenten behandelt. Neben S1P wurden die Mengen von Sphingomyelin, Ceramid und Sphingosin in DCs bestimmt.

Wie in Abbildung 21 dargestellt ist, unterschieden sich die verschiedenen Sphingolipid-Mengen in iDCs deutlich voneinander ($p < 0,05$). Die höchsten Werte erreichte Sphingomyelin, das im Mittel zu 3306 ± 1165 pmol enthalten war. Die weitere Sphingolipidanalyse in iDCs ergab für Ceramid im Mittel $127,50 \pm 25,54$ pmol, für Sphingosin $3,75 \pm 0,94$ pmol und für S1P $3,51 \pm 0,71$ pmol.

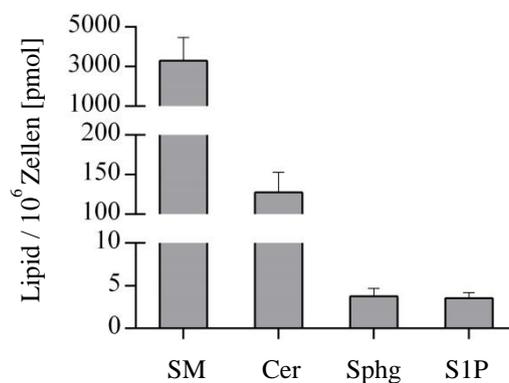


Abbildung 21: Lipidanalyse in iDCs. Zur Probengewinnung der dendritischen Zellen wurde wie in Abschnitt 3.5 vorgegangen. Die Lipidanalyse beinhaltete die Messung von Sphingomyelin (SM), Ceramid (Cer), Sphingosin (Sphg) und S1P. $n = 3$.

In Abbildung 22 ist die Lipidanalyse nach LPS-Ausreifung und MV-Infektion (Infektionsrate $> 50\%$) dargestellt. Lediglich die S1P- und Sphingosinwerte wiesen nach Behandlung signifikante Unterschiede zu iDCs auf. Analog zu den Ergebnissen aus 4.1 entsprachen die für infizierte Kulturen ermittelten S1P-Werte denen der iDCs, während eine deutliche Reduktion in mDCs gemessen wurden. Das intrazellulär

vorhandene Sphingosin verringerte sich nach MV-Infektion auf $66,7 \pm 7,6 \%$ und nach Ausreifung zeigte sich ebenfalls eine abnehmende Tendenz in Bezug auf iDCs. In allen analysierten Proben lag mehr Sphingosin in mDCs als in MV-infizierten DCs vor. Dies konnte auch bei den Vorläufern Sphingomyelin und Ceramid trotz großer interindividueller Schwankungen durchgängig beobachtet werden. Nur für SIP konnte ein gegenläufiges Verhalten festgestellt werden: Die Werte lagen signifikant über denjenigen nach Ausreifung..

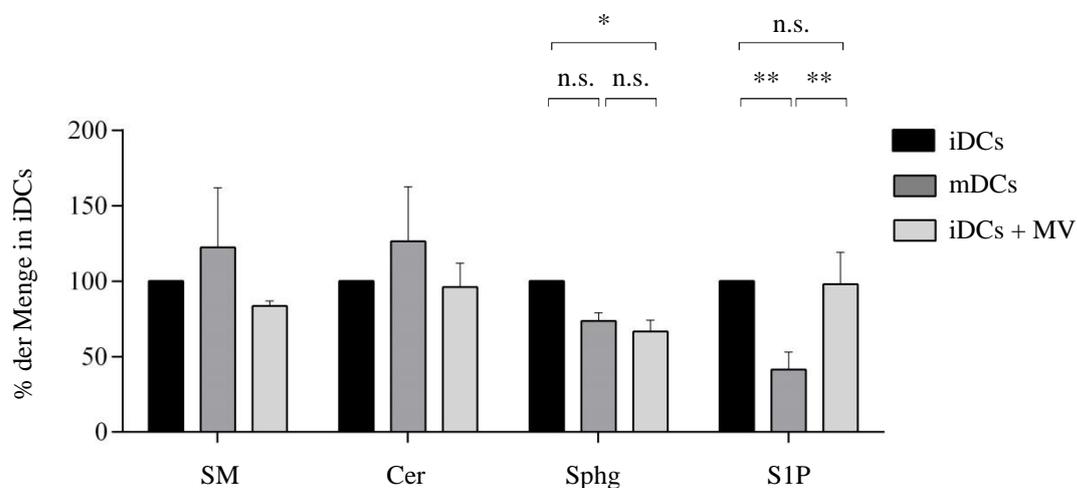


Abbildung 22: Lipidanalyse in DCs nach Ausreifung und MV-Infektion. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung zur Menge in un- bzw. Mock-behandelten iDCs. n = 3. *p < 0,05. **p < 0,01.

Das intrazellulär gemessene Sphingomyelin und Ceramid wurden hinsichtlich der Fettsäuren näher charakterisiert. Es wurden sowohl gesättigte Fettsäuren einer Kettenlänge von 16, 18, 20 und 24 C-Atomen (C16, C18, C20, C24), als auch ungesättigte Fettsäuren einer Kettenlänge von 24 C-Atomen (C24:1) gefunden. Abbildung 23 zeigt die Anteile der unterschiedlichen Fettsäuren am Sphingomyelin, die sich weder nach Ausreifung noch MV-Infektion in ihrer Zusammensetzung veränderten. In allen Proben bestand der Großteil des Sphingomyelins aus der langkettigen Fettsäure C16 ($73,6 \% \pm 2,9 \%$), sehr langkettige Fettsäuren (C22, C24, C24:1) machten hingegen einen kleineren Beitrag ($24,3 \% \pm 2,3 \%$) aus.

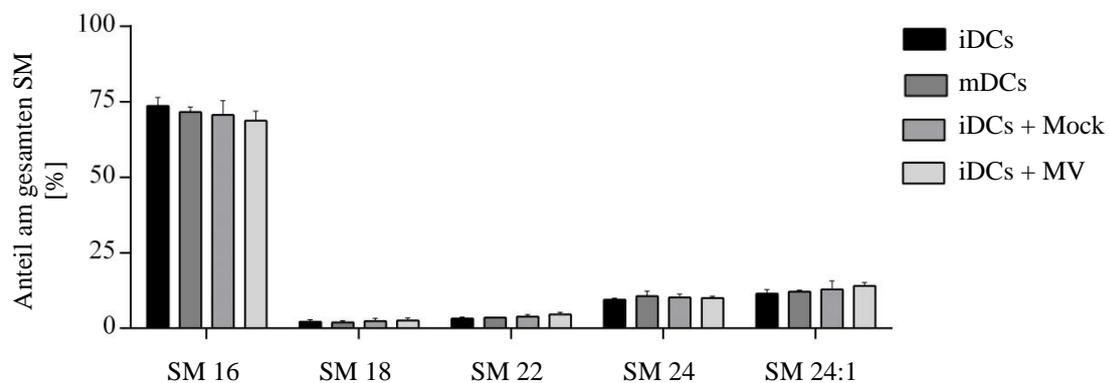


Abbildung 23: Zusammensetzung des Sphingomyelins in DCs. Die Zellen wurden auf Veränderungen der Konstitution des Sphingomyelins nach Ausreifung und MV-Infektion untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Subtypen (SM 16, SM 18, SM 22, SM 24 und SM 24:1) am gesamten Sphingomyelin. n = 3.

Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, beinhaltet das Ceramid in iDCs im Gegensatz zum Sphingomyelin hauptsächlich sehr langkettige Fettsäuren ($73,2 \% \pm 2,7 \%$). Dieser Anteil verringerte sich nach Ausreifung, nicht jedoch nach MV-Infektion signifikant um $10,3 \% \pm 5,1 \%$, der Anteil an der langkettigen Fettsäure C16 vergrößerte sich um denselben Wert. Erkennbar ist auch, dass dies zu einem veränderten Verhältnis zwischen sehr lang- und langkettigen Fettsäuren führte.

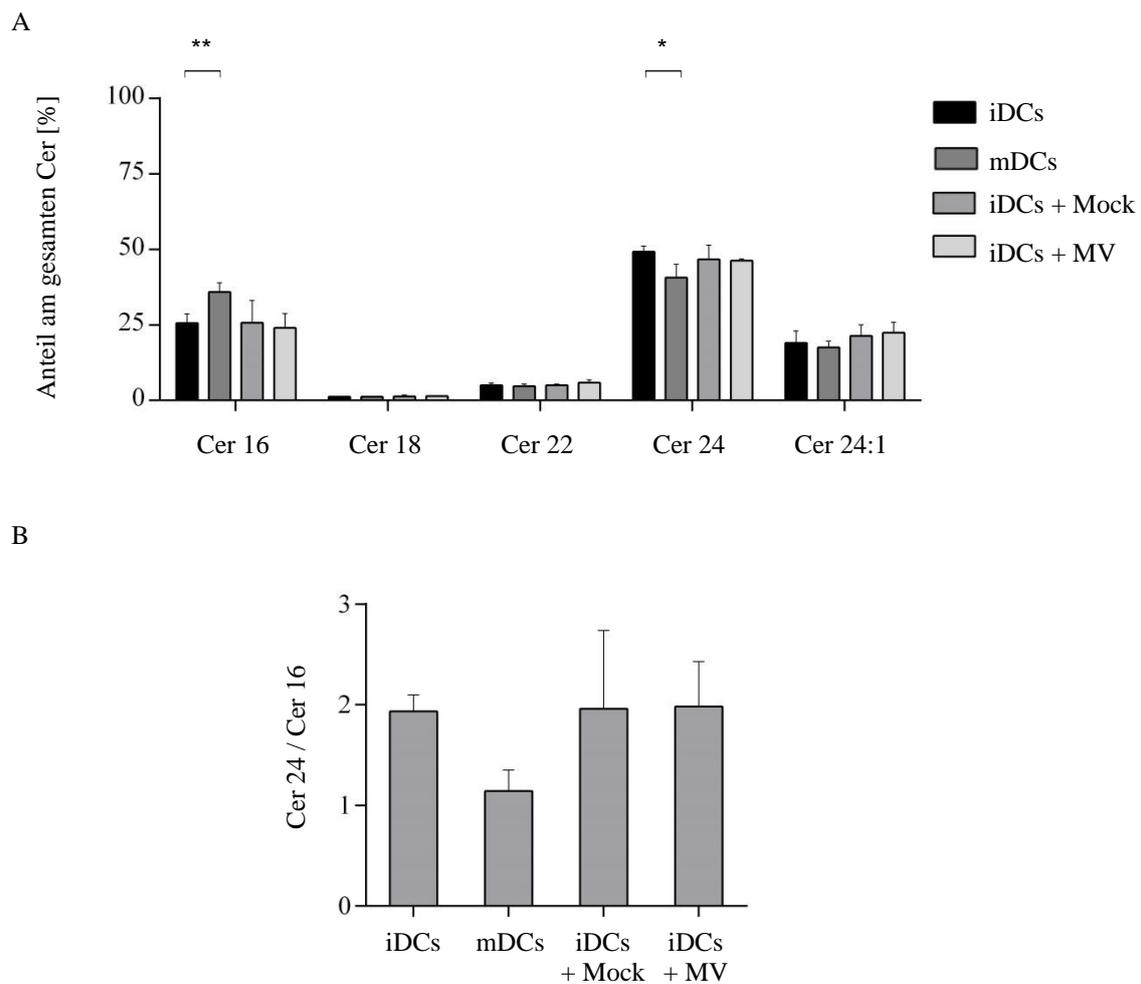


Abbildung 24: Zusammensetzung des Ceramids in DCs. Die Zellen wurden auf Veränderungen der Konstitution des Ceramids nach Ausreifung und MV-Infektion untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Subtypen (Cer 16, Cer 18, Cer 22, Cer 24 und Cer 24:1) am gesamten Ceramid (A). Dabei wurde das Verhältnis zwischen sehr lang- und langkettigen Fettsäuren anhand von Cer 24 und Cer 16 berechnet (B). n = 3. *p < 0,05. **p < 0,01.

4.2.3 Expression der Sphingosinkinasen und S1P-Lyase in DCs nach Ausreifung und MV-Infektion mittels semiquantitativer RT-PCR

Nachfolgend wurde mittels RT-PCR ermittelt, ob sich die Akkumulation S1P-metabolisierender Enzyme in DCs auf RNA-Ebene in Abhängigkeit von Reifung bzw. Infektion nach 24 Stunden verändert. Zusätzlich wurden Mock- und unbehandelte Proben analysiert. Um sowohl den direkten Auf- als auch den Abbau S1Ps zu adressieren, wurden spezifische Primer der Sphingosinkinase 1 (SphK1),

Sphingosinkinase 2 (SphK2) und S1P-Lyase (SPL) verwendet. Abbildung 25 stellt die Ergebnisse nach Normalisierung dar. Bei dieser semiquantitativen Methode wurden nach den Behandlungen weder Unterschiede der RNA-Expression von SphK1 ($p = 0,52$) und SphK2 ($p = 0,50$), noch von SPL ($p = 0,17$) detektiert, womit eine Regulation auf RNA-Ebene nicht wahrscheinlich war.

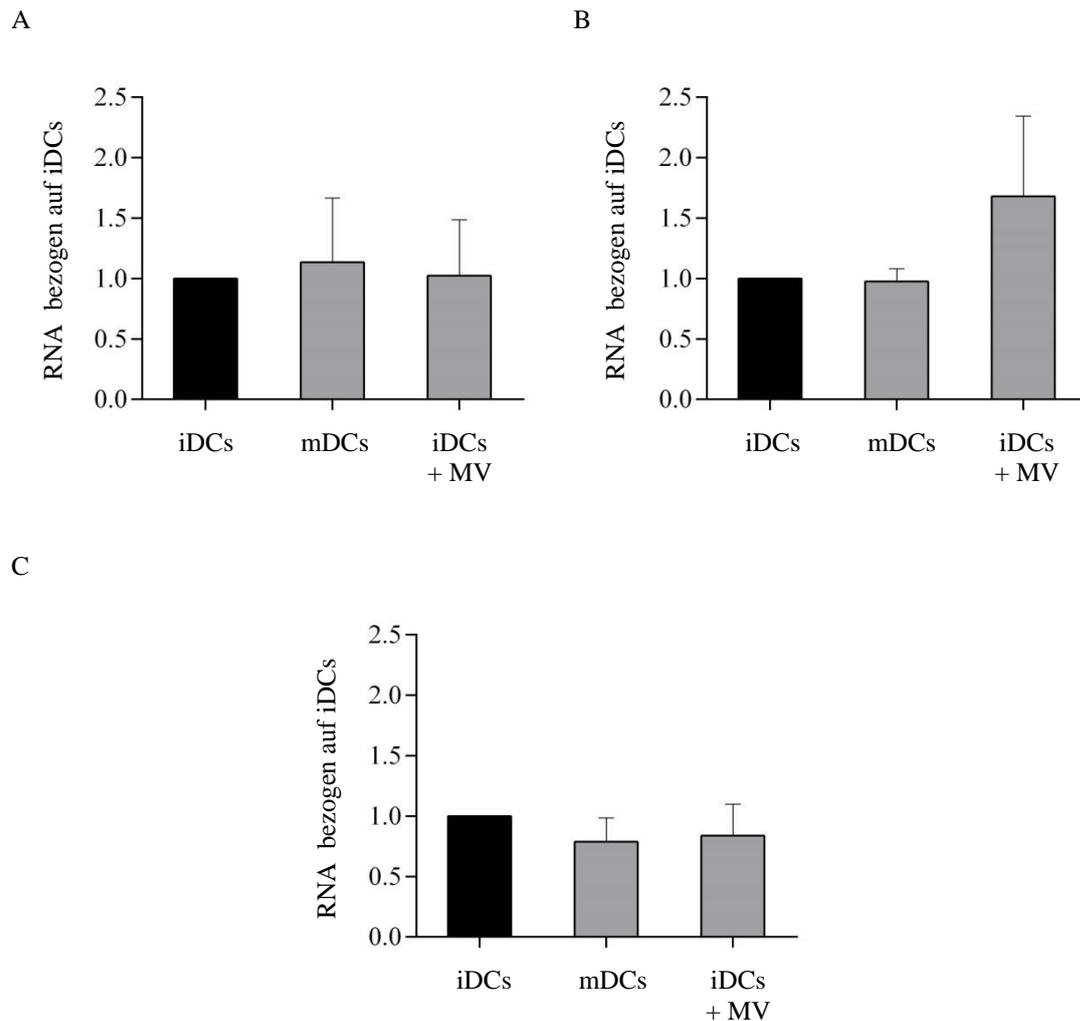


Abbildung 25: RNA-Expression von SphK1, SphK2 und SPL in DCs. Zellen wurden analog zu Abb. 12 behandelt. Anschließend wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert und mittels PCR amplifiziert. Nach Gelelektrophorese und Densitometrie wurden die Ergebnisse auf β -Aktin normalisiert. Untersucht wurde die SphK1 (A), die SphK2 (B) und die SPL (C). Dargestellt sind die Veränderungen bezogen auf un- bzw. Mock-behandelte iDCs. SphK1, SPL: $n = 5$. SphK2: $n = 2$.

Die bisher aufgeführten Ergebnisse legen eine Modulation des S1P-Gehalts in DCs in Abhängigkeit verschiedener Stimuli nahe. Während eine Ausreifung den S1P-Gehalt reduziert, wird intrazelluläres S1P in hoch infizierten Kulturen reteniert. Aufgrund fehlender Akkumulation seiner Vorläufer ist dies wahrscheinlich Folge einer veränderten Aktivität der SphK oder abbauender Enzyme. Der relativ hohe S1P-Gehalt könnte sich auf die Replikation des MV oder auch auf die Funktion der DCs im Laufe der Infektion auswirken. Letzteres wird im folgenden Abschnitt analysiert.

4.3 Beitrag des S1Ps in DCs zur T-Zellchemotaxis

Da S1P als Chemokin agieren kann, sollte ermittelt werden, ob das in DCs detektierte und möglicherweise auch sezernierte S1P einen Beitrag zur T-Zellchemotaxis leistet. Die Messung der T-Zellchemotaxis erfolgte über den in Abschnitt 3.7 beschriebenen Transwell-Assay, wobei zwei Kompartimente durch einen Filter definierter Porengröße getrennt wurden, durch den die T-Zellen innerhalb von 3 Stunden vom oberen ins untere Kompartiment migrieren konnten. Zur Induktion der Chemotaxis befanden sich im unteren Kompartiment DCs oder das Chemokin SDF-1 α . Die Erfassung der Spontanmigration erfolgte über eine Kontrolle ohne Chemokin, was zugleich die Basis zur Berechnung des Migrationsindex darstellte.

4.3.1 Chemoattraktives Potenzial ausgereifter DCs auf T-Zellen

Zur Klärung des Beitrags von S1P zum chemoattraktiven Potenzial dendritischer Zellen musste zunächst gezeigt werden, dass diese im Transwell-Assays Migration induzieren können. Da in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe mDC-Überstände zu einer T-Zell-Migration führten, wurden zur Methodenetablierung mDCs eingesetzt. Die Ausreifung erfolgte auch hier über eine 24-stündige Behandlung mit LPS oder TNF- α , PGE₂, IL-1 β und IL-6 β .

4.3.1.1 Migration von Jurkat-T-Zellen in Antwort auf mDCs

Um spenderspezifische Varianzen zu vermeiden, wurden zunächst Jurkat-T-Zellen verwendet (6 x 10⁶ / ml, Filterporen: 8 μ m). Zur Beurteilung der chemoattraktiven

Fähigkeit dendritischer Zellen wurde neben dem Ansatz mit mDCs auch eine Negativkontrolle untersucht (Migrationsmedium ohne DCs).

Auf Abbildung 26 ist die durchflusszytometrisch bestimmte Anzahl der Jurkat-T-Zellen im unteren Kompartiment dargestellt. Spontan- und induzierte Migrationseffizienzen wiesen einen deutlichen Unterschied auf. Bezogen auf die eingesetzte Jurkat-T-Zellzahl migrierten 0,71 % der Zellen ins Kompartiment der mDCs. Dies war um den Faktor 8,5 höher als die Anzahl spontan migrierter Zellen in der Negativkontrolle. Somit war es möglich im Rahmen von Transwell-Assays über mDCs Jurkat-T-Zellmigration zu induzieren. Im Folgenden wurde diese Methode auf primäre T-Zellen angewendet.

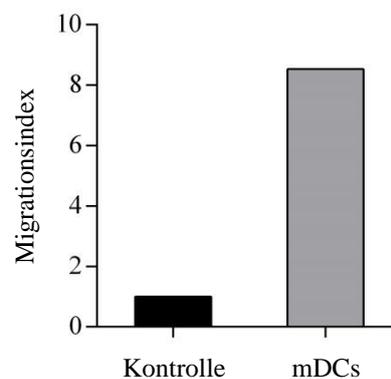


Abbildung 26: Jurkat-T-Zell-Chemotaxis in Antwort auf mDCs. Jurkat-T-Zellen wurden in das obere Kompartiment des Transwell-Assays gesetzt (5×10^6 / ml), mDCs sowie eine Negativkontrolle ins untere. Nach 3 h erfolgte die Quantifizierung über die durchflusszytometrischer Messung der gesamten Probe. Abgebildet ist der Migrationsindex in Antwort auf mDCs. n = 1.

4.3.1.2 Migration primärer T-Zellen aus verschiedenen Kulturmedien in Antwort auf mDCs

Der Einsatz primärer T-Zellen ist physiologischer, zeigt jedoch interindividuelle Schwankungen. Der Transwell-Assay wurde im allogenen System mit einer Anzahl von 1×10^6 T-Zellen (1×10^7 / ml) und einer Porengröße von $5 \mu\text{m}$ durchgeführt.

Zur Optimierung des Transwell-Assays wurde der Einfluss des Kulturmediums auf die Migrationsbereitschaft von T-Zellen untersucht. Nach T-Zellkultur in RPMI / 10 % FBS

folgte dabei 3 h vor Experiment entweder ein Serumentzug in 0,5 % BSA / RPMI oder eine Fortsetzung der vorherigen Kulturbedingungen. Um Aussagen über die allgemeine Migrationsfähigkeit der T-Zellen treffen zu können, wurden neben Transwell-Assays mit Negativkontrollen (ohne DCs) und mDCs auch Positivkontrollen mit SDF-1 α (1 μ g / ml) durchgeführt. Die Quantifizierung der migrierten T-Zellen erfolgte durch durchflusszytometrische Messung der Probe. Das Resultat dieser Analyse ist in Form der Migrationsindices in Abbildung 27 zu sehen. Die migratorische Aktivität primärer T-Zellen lag unter der von Jurkat-T-Zellen. In Antwort auf mDCs migrierten hier weniger als 0,5 % der eingesetzten T-Zellen, was sich nach 3 h serumfreier Behandlung nochmals verringerte. Bei Normierung auf die Negativkontrollen erwies sich der Migrationsindex Serum-depletierter T-Zellen in Antwort auf mDCs als erhöht. Der Migrationsindex nicht Serum-depletierter T-Zellen betrug $1,68 \pm 0,60$ und war damit um $51,9 \% \pm 12,7 \%$ niedriger als der SDF-1 α -abhängige. Serum-depletierte T-Zellen wiesen einen Migrationsindex von $6,18 \pm 4,21$ auf, der um $16,8 \% \pm 8,2 \%$ niedriger war als der SDF-1 α -abhängige. Die serumfreie Behandlung führte somit zwar zu einer allgemein reduzierten Migration, gleichzeitig aber zu höheren Migrationsindices und zu einer Annäherung der mDC-induzierten Migration an die SDF-1 α -induzierte.

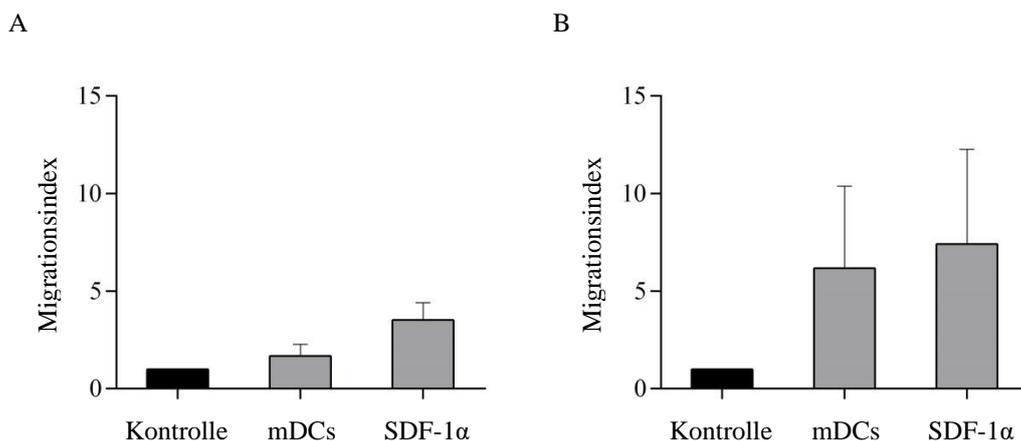


Abbildung 27: Chemotaxis primärer T-Zellen nach 3 h Serumentzug. Primäre T-Zellen (TZ) wurden in RPMI / 10 % FBS kultiviert. 3 h vor dem Experiment erfolgte ein dreistündiger Serumentzug in 0,5 % BSA / RPMI (B). Ein weiterer Ansatz wurde im bisherigen Kulturmedium belassen (A). Die verschieden kultivierten T-Zellen wurden mittels Transwell-Assay hinsichtlich ihrer Migrationsfähigkeit in Antwort auf SDF-1 α und allogene mDCs getestet. Dargestellt sind die Ergebnisse in Form des Migrationsindex. n = 3.

Um den detektierten positiven Effekt des Serumentzugs nutzen zu können, gleichzeitig aber zu versuchen, die absolute Anzahl an migrierten T-Zellen zu erhöhen, wurden diese in X-Vivo, einem für serumfreie Zellkultur optimierten Medium, kultiviert. Der Vergleich erfolgte mit T-Zellen aus Kultur mit RPMI / 10 % FBS. Es wurde sowohl die Spontanmigration (ohne DCs) als auch die Migration in Antwort auf mDCs gemessen. Dabei wurden die migrierten T-Zellen im Gegensatz zu vorherigen Experimenten durchflusszytometrisch mittels Counterbeads quantifiziert. Abbildung 28 zeigt die verschiedenen kultivierten T-Zellen hinsichtlich ihrer Migrationsbereitschaft auf mDCs nach Berechnung des Migrationsindex. Während der Index bei T-Zellen, welche in RPMI / 10 % FBS kultiviert wurden, $1,93 \pm 0,55$ betrug, erreichte er bei T-Zellen aus serumfreien X-Vivo $2,69 \pm 1,14$.

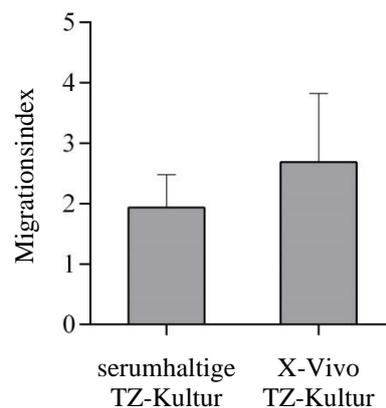


Abbildung 28: Chemotaxis primärer T-Zellen aus serumfreier X-Vivo-Kultur. Primäre T-Zellen wurden mindestens 24 h sowohl in RPMI / 10 % FBS als auch in X-Vivo kultiviert. Mittels Transwell-Assay wurde ihre Migrationsfähigkeit in Antwort auf allogene mDCs untersucht. Die Quantifizierung der migrierten T-Zellen erfolgte über Counterbeads. Dargestellt sind die Ergebnisse in Form des Migrationsindex. n = 3.

Daraufhin erfolgte die Analyse der durch mDCs induzierten T-Zellchemotaxis in 13 weiteren Experimenten mit unterschiedlichen Spenderinnen und Spendern. Um dabei eine optimale Migrationsbereitschaft zu erzielen, wurden T-Zellen vor dem Transwell-Assay 24 h lang in serumfreien X-Vivo kultiviert und die Quantifizierung der

migrierten T-Zellen erfolgte anhand von Counterbeads. Im Mittel migrierten 2,4 % der eingesetzten T-Zellen in Antwort auf mDCs unabhängig von deren Ausreifungsprotokoll. Im Vergleich zur Spontanmigration erwies sich dies mit einem Migrationsindex von $2,01 \pm 0,53$ als hoch signifikant (Abb. 29).

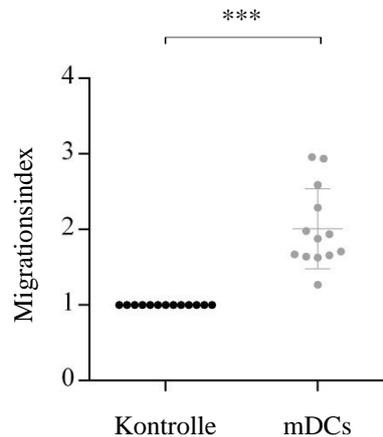


Abbildung 29: Chemotaxis primärer T-Zellen in Antwort auf mDCs. Primäre T-Zellen wurden 24 h lang in X-Vivo kultiviert. Mittels Transwell-Assay wurde ihre Migrationsfähigkeit in Antwort auf allogene mDCs untersucht. Die Ausreifung der DCs erfolgte mittels LPS oder TNF- α , PGE₂, IL-1 β und IL-6 β 24 h vor Transwell-Assay. Zur Zählung der migrierten T-Zellen dienten Counterbeads. Dargestellt sind die Ergebnisse in Form des Migrationsindex. n = 13. ***p < 0,001.

4.3.1.3 Vergleich des chemoattraktiven Potenzials ausgereifter DCs zur Chemoattraktion durch SDF-1 α

Zur besseren Einschätzung der Effektivität der chemoattraktiven Fähigkeit dendritischer Zellen, wurde diese der Chemoattraktion durch SDF-1 α gegenübergestellt. Die Behandlung der Zellen erfolgte analog zu den vorherigen Experimenten. Im Transwell-Assay wurde sowohl die Spontanmigration mittels Negativkontrolle (ohne DCs), als auch die SDF-1 α - und mDCs-induzierte Migration erfasst. Abbildung 30 vergleicht das chemoattraktive Potenzial mittels Migrationsindices, die zeigen, dass der Mittelwert in der eingesetzten Konzentration der Antwort auf mDCs 5-fach niedriger lag als der für SDF-1 α .

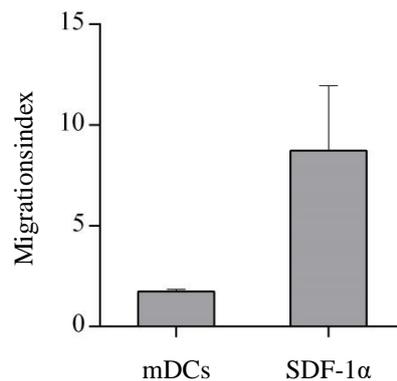
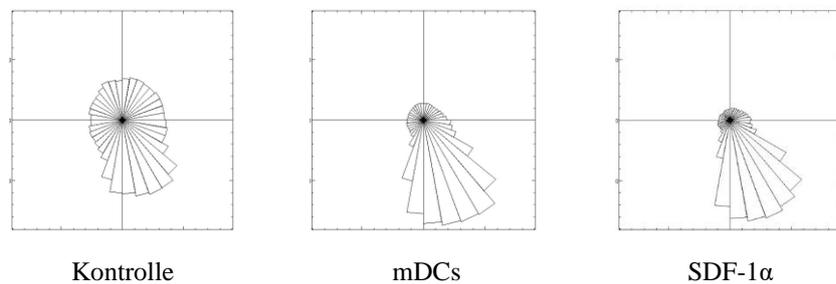


Abbildung 30: Vergleich des chemoattraktiven Potenzials zwischen mDCs und SDF-1 α . Mittels Transwell-Assay wurde die Induktion der T-Zellchemotaxis durch SDF-1 α (1 μ g/ml) und mDCs untersucht. Die Ausreifung der DCs erfolgte 24 h vor Experiment. Die Ergebnisse sind in Form des Migrationsindex dargestellt. n = 4.

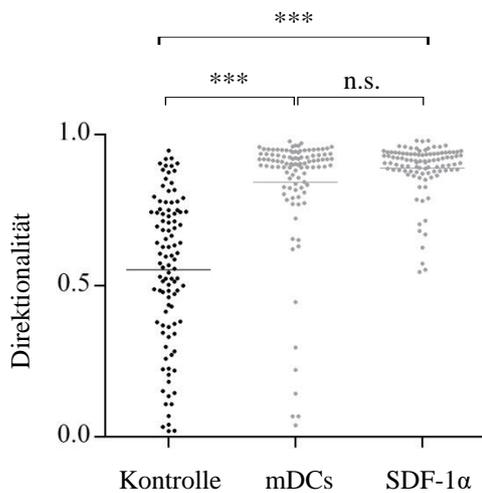
Der Vergleich zwischen mDCs- und SDF-1 α -induzierten T-Zellchemotaxis mittels Transwell-Assays lässt lediglich quantitative Aussagen zu, es können jedoch keine Aussagen zur Qualität der Migration getroffen werden. Über die Aufnahme von Bildern in einem zweidimensionalen System war es möglich, die T-Zellchemotaxis in Antwort auf mDCs näher zu charakterisieren und verschiedene Parameter mit der SDF-1 α -induzierten Chemotaxis zu vergleichen. Parameter der Qualität umfassten dabei Direktionalität als Ausmaß der Geradlinigkeit der Bewegung und Geschwindigkeit der Zellen. Die Negativkontrolle erfasste analog zum Transwell-Assay die ungerichtete Spontanmigration (ohne DCs). Für die Auswertung der Daten wurden pro Ansatz 100 T-Zellen auf der Bildserie manuell verfolgt und hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens untersucht, was in Abbildung 31 dargestellt ist. Das Diagramm zur Richtungstendenz entstand, indem ausgehend vom Mittelpunkt als Startpunkt die einzelnen Strecken der analysierten T-Zellen zusammengefasst wurden. Am unteren Bildrand sind das Chemokin SDF-1 α bzw. die mDCs zu lokalisieren. Sowohl im Ansatz mit mDCs, als auch in demjenigen mit SDF-1 α migrierte die Mehrheit der T-Zellen in Richtung des Stimulus, während in der Negativkontrolle eine unspezifische Bewegung stattfand. Die Berechnung der Direktionalität führte zu Werten zwischen 0 und 1, wobei 1 maximale Geradlinigkeit definiert. Diese Berechnung zeigte, dass die Bewegung der T-Zellen auf mDCs und auf SDF-1 α deutlich richtungsassoziiert ($p < 0,001$) war. Das Ausmaß der Direktionalität zwischen SDF-1 α - und mDCs-induzierter T-Zellchemotaxis zeigte dabei

keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,96$). In der Geschwindigkeit unterschieden sich alle Ansätze signifikant voneinander ($p < 0,01$). Im Mittel migrierten T-Zellen in der Negativkontrolle $1,38 \pm 0,64 \mu\text{m} / \text{Minute}$, bei der Probe mit mDCs $1,80 \pm 0,62 \mu\text{m} / \text{Minute}$ und bei derjenigen mit SDF-1 α $2,17 \pm 0,60 \mu\text{m} / \text{Minute}$. Die quantitative und auch qualitative Beurteilung der mDCs-induzierten T-Zellchemotaxis machte damit deutlich, dass T-Zellen besser auf SDF-1 α als auf mDCs reagierten.

A



B



C

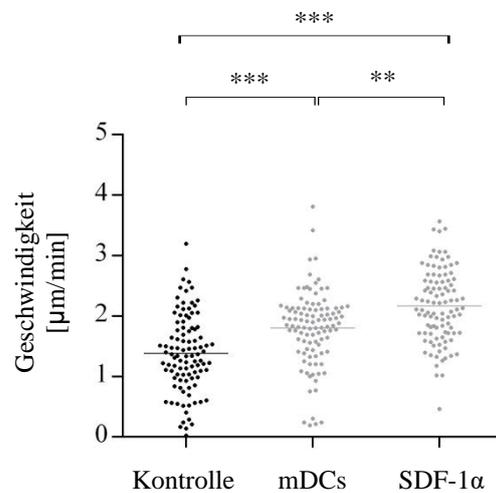


Abbildung 31: Qualitative Analyse der T-Zellchemotaxis in Antwort auf mDCs und SDF-1 α . Mit Channelslides wurde ein Chemotaxis-Assay am Mikroskop durchgeführt. Neben der Negativkontrolle wurde das chemoattraktive Potenzial von mDCs und SDF-1 α ($1 \mu\text{g} / \text{ml}$) analysiert. Das Diagramm zur Richtungstendenz setzt sich pro Probe aus den von den T-Zellen zurückgelegten Strecken zusammen. Die gerichtete Migration erfolgte zum unteren Bildrand (A). Bei der Darstellung der Direktionalität (B) und der Geschwindigkeit (C) entspricht jeder Punkt dem durchschnittlichen Parameter einer einzelnen T-Zelle. Pro Ansatz wurden 100 Zellen analysiert. $n = 1$. *** $p < 0,001$.

4.3.2 Einfluss von Ausreifung und MV-Infektion dendritischer Zellen auf die Migration primärer T-Zellen

Bisher erfolgte die Analyse der T-Zellchemotaxis in Antwort auf mDCs. Ob unterschiedlich behandelte DCs sich hinsichtlich ihres chemoattraktiven Potenzials unterscheiden, wurde nachfolgend in Transwell-Assays untersucht.

Zunächst wurde die T-Zellchemotaxis in Antwort auf iDCs und auf mDCs verglichen. Die 24-stündige Behandlung zur Ausreifung erfolgte wie in Abschnitt 4.3.1. Nach Quantifizierung mittels Counterbeads und Berechnung des Migrationsindex konnte festgestellt werden, dass auch iDCs T-Zellchemotaxis induzierten, und zwar, wie der Abbildung 32 zu entnehmen ist, ebenso effizient wie mDCs ($p = 0,25$).

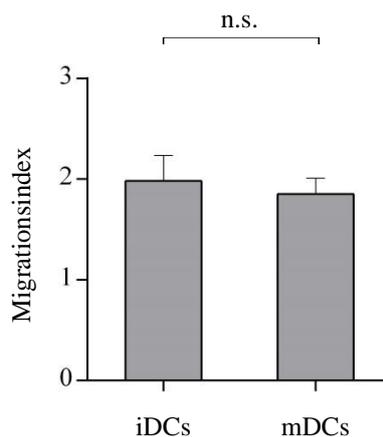


Abbildung 32: Vergleich des chemoattraktiven Potenzials zwischen iDCs und mDCs. DCs wurden mittels LPS oder TNF- α , PGE₂, IL-1 β und IL-6 β ausgereift. Der Transwell-Assay erfolgte 24 h nach Zugabe der Induktoren. Dargestellt sind die Migrationsindices. $n = 3$.

DCs, die vor dem Transwell-Assay für 24 h MV (MOI 2) bzw. Mock exponiert waren, induzierten T-Zell-Migration mit den in Abbildung 33 dargestellten Migrationsindices von $2,23 \pm 0,73$ (Mock-behandelte iDCs), $2,29 \pm 0,66$ (mDCs) und $1,96 \pm 0,72$ (MV-infizierten DCs). Es zeigten sich weder signifikante Unterschiede untereinander noch zu mDCs ($p = 0,36$).

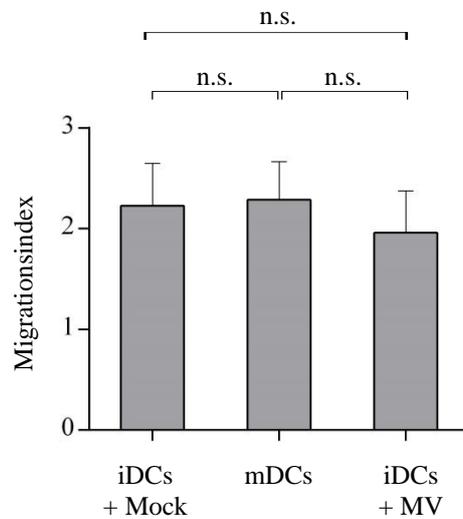


Abbildung 33: Vergleich des chemoattraktiven Potenzials nach Ausreifung und MV-Infektion. DCs wurden mit Mock behandelt, mit MV infiziert und ausgereift. 24 h nach Behandlung erfolgte der Transwell-Assay. Die Ergebnisse sind in Form des Migrationsindex abgebildet. n = 3.

4.3.3 Bedeutung des S1P₁-Rezeptors für die Migration primärer T-Zellen in Antwort auf mDCs

Bisher ließen sich lediglich Aussagen über das allgemeine chemoattraktive Potenzial dendritischer Zellen treffen, nicht jedoch über die involvierten einzelnen Chemokine. Um S1P als möglichen Mediator zu identifizieren, wurde zunächst die Beteiligung des S1P₁-Rezeptors für die T-Zellmigration überprüft.

4.3.3.1 Oberflächenexpression des S1P₁-Rezeptors in T-Zellen nach Einsetzen in serumfreies Medium

Die Oberflächenexpression des S1P₁-Rezeptors ist notwendige Voraussetzung für die Reaktivität von T-Zellen über diese Signaltransduktion. Sie wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ansetzen einer Kultur mit serumfreien X-Vivo durchflusszytometrisch bestimmt. Die Kinetik der Anzahl S1P₁-positiver Zellen ist in Abbildung 34 dargestellt. Es zeigte sich erst nach 24 h eine signifikante Zunahme der S1P₁-Oberflächenexpression ($p < 0,05$). Zu diesem Zeitpunkt lag der Anteil S1P₁-

positiver T-Zellen bei $40,5 \% \pm 13,9 \%$. Zusätzlich wurde bei einem Spender ein weiterer Zeitpunkt nach 48 h in die Messungen aufgenommen. Der beobachtete Aufwärtstrend setzte sich nicht fort. Aufgrund dieser S1P₁-Kinetik wurden in folgende Experimente nur noch T-Zellen nach 24-stündigen serumfreier Kultur (X-Vivo) eingesetzt.

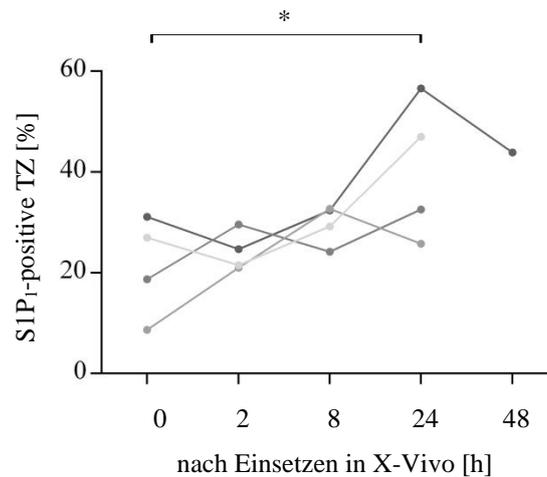


Abbildung 34: S1P₁-Oberflächenexpression in T-Zellen nach Einsetzen in X-Vivo. Zellen wurden nach 0 h, 2 h, 8 h sowie 24 h serumfreier X-Vivo-Kultur mit einem S1P₁-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Bei n = 1 wurde zusätzlich nach 48 h die S1P₁-Oberflächenexpression analysiert. Als S1P₁-positiv galten Zellen, die höhere Intensitäten als bei Färbung mit Isotyp-Antikörper aufwiesen. In der Darstellung bezieht sich der Signifikanztest auf einen Unterschied zwischen 0 h und 24 h nach Ansetzen der Kultur. n = 4. *p < 0,05.

4.3.3.2 Wirkung des S1P₁/S1P₃-Rezeptor-Inhibitors VPC 23019 auf die T-Zellviabilität

Da T-Zellen S1P₁ an ihrer Oberfläche exprimierten, wurde analysiert, ob die Hemmung dieses Rezeptors durch VPC 23019 (kompetitiver Antagonist sowohl für S1P₁ als auch S1P₃) in einer reduzierten Chemotaxis auf mDCs resultierte.

Der Einfluss von VPC 23019 auf die Viabilität der T-Zellen wurde nach zweistündiger Inhibitor-Behandlung (50 µM) durchflusszytometrisch überprüft. Abbildung 35 vergleicht PI-positive Zellen zwischen Inhibitor-, Lösungsmittel- und unbehandelten T-Zellen. Unter den getesteten Bedingungen zeigte sich keine Zytotoxizität des Inhibitors.

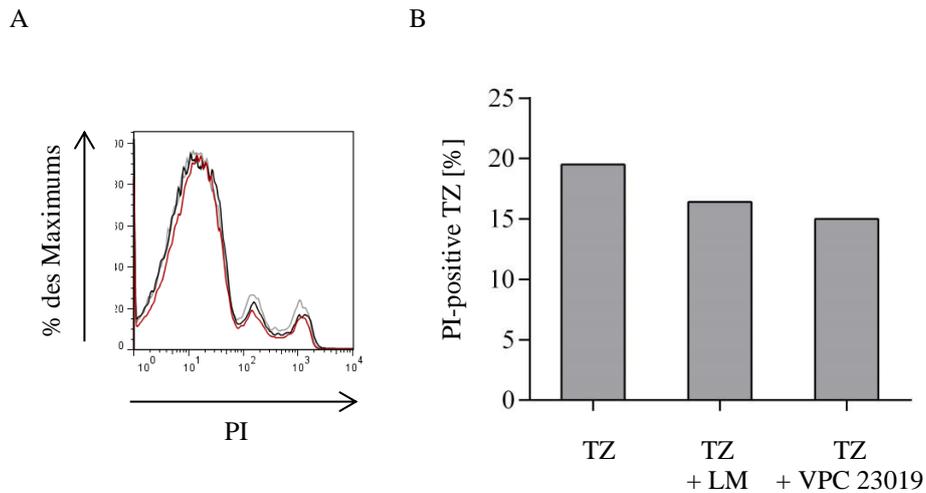


Abbildung 35: Prüfung von VPC 23019 auf T-Zellzytotoxizität. T-Zellen wurden über 2 h mit Inhibitor (50 μ M) (rote Linie) und dessen Lösungsmittel (LM) (schwarze Linie) behandelt. Der Vitalitätstest erfolgte über Färbung toter Zellen mittels Propidiumiodid (PI), welche anschließend durchflusszytometrisch detektiert wurden. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (graue Linie). Dargestellt sind die Ergebnisse in Form eines Histogramms (A) und die Veränderungen des Anteils an PI-positiven Zellen (B).

4.3.3.3 Auswirkungen des Inhibitors VPC 23019 auf die T-Zellchemotaxis in Antwort auf mDCs

Um die Auswirkung einer Behandlung mit VPC 23019 auf die Migrationsbereitschaft von T-Zellen in Antwort auf mDCs zu untersuchen, wurden diese für 1,5 h mit Inhibitor (oder Lösungsmittel) vor der Analyse der T-Zellchemotaxis inkubiert. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für die ermittelten Migrationsindices ($p = 0,28$), tendenziell war jedoch eine leichte Reduzierung des Index nach Inhibitor Behandlung zu sehen war.

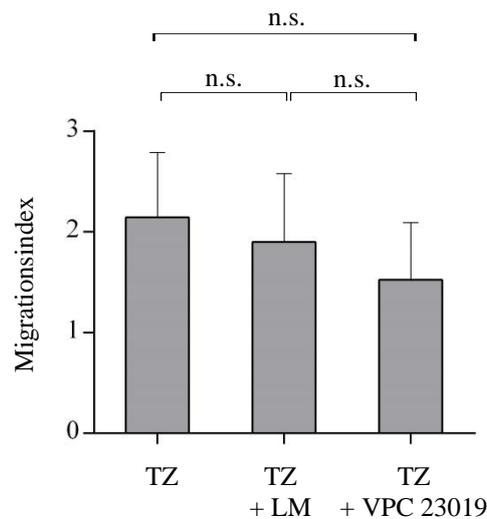


Abbildung 36: T-Zellchemotaxis in Antwort auf mDCs nach Hemmung von S1P₁ und S1P₃. T-Zellen wurden 1,5 h mit VPC 23019 (50 µM) und Lösungsmittel (LM) präinkubiert oder unbehandelt belassen. Die verschieden behandelten T-Zellen wurden im Transwell-Assay auf ihre spontane Migrationsbereitschaft und die induzierte Chemotaxis in Antwort auf mDCs untersucht. Abgebildet sind die Migrationsindices dieser Analyse. n = 4.

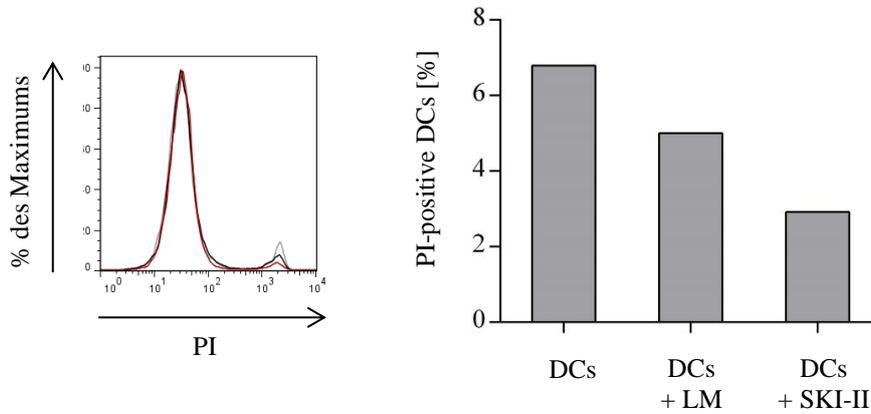
4.3.4 Einfluss des Sphingosinkinase-Inhibitors SKI-II auf die T-Zellchemotaxis in Antwort auf mDCs

Die bisherige Untersuchung zur Rolle S1Ps bei T-Zellchemotaxis betraf einzig dessen Signaltransduktion via S1P₁ und S1P₃. Um eine allgemeinere Aussage zum Beitrag S1Ps zur T-Zell-Attraktion zu erhalten, sollte nun die S1P-Menge in den DCs durch Hemmung der SphK vermindert werden.

4.3.4.1 Wirkung des SphK-Inhibitors SKI-II auf die Zellviabilität

Zur Hemmung wurde der Inhibitor SKI-II verwendet, der sowohl SphK1 und SphK2 blockiert. Zur Ermittlung seiner Toxizität wurde SKI-II (10 µM) oder dessen Lösungsmittel für 5 h zu einer Mischpopulation von DCs und T-Zellen gegeben, die nachfolgend auf ihren Anteil PI-positiver Zellen durchflusszytometrisch analysiert wurde. Hierbei konnte keine (für DCs) bzw. eine geringe Zunahme der PI-positiver Zellen auf ca. 1 % (für T-Zellen) gemessen werden (Abb. 37). Auf DCs erwies sich SKI-II interessanterweise vielmehr als vitalitätsfördernd.

A



B

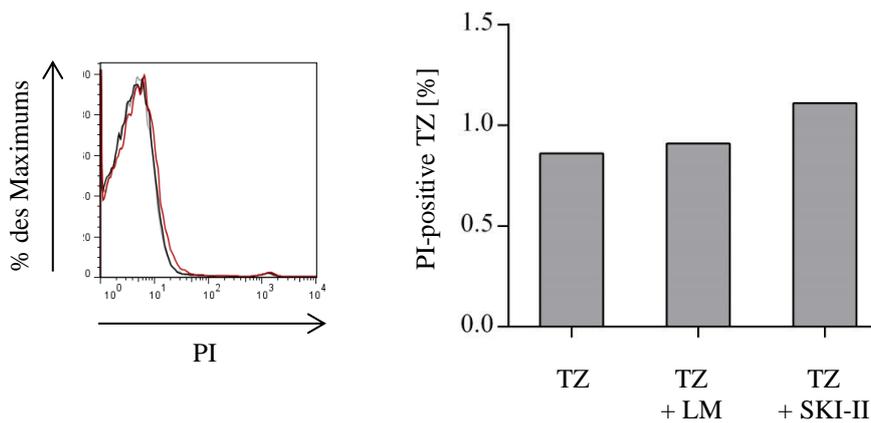


Abbildung 37: Prüfung von SKI-II auf Zytotoxizität. DCs und T-Zellen wurden über 5 h in Anwesenheit des Inhibitors SKI-II (10 μ M) (rote Linie) und dessen Lösungsmittels (schwarze Linie), sowie als Kontrolle unbehandelt (graue Linie) inkubiert. Dargestellt sind die Ergebnisse in Form eines Histogramms und die Veränderungen in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle sowohl bei DCs (A) als auch bei T-Zellen (B).

4.3.4.2 Einfluss des Inhibitors SKI-II auf die T-Zellchemotaxis

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer SKI-II-Behandlung auf das chemoattraktive Potenzial von mDCs wurden diese über 2 h mit Inhibitor (oder dem Lösungsmittel) präinkubiert. Der anschließende Transwell-Assay erfolgte in Anwesenheit des Inhibitors im unteren Kompartiment. Wie in Abbildung 38 zu sehen, reduzierte die Behandlung mit SKI-II ($p < 0,05$), nicht aber mit dem Lösungsmittel die T-Zellchemotaxis auf

mDCs. Die Anzahl migrierter T-Zellen nahm in Antwort auf SKI-II-behandelte mDCs im Vergleich zu unbehandelten mDCs um $34,0 \pm 16,4\%$ ab. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p = 0,08$).

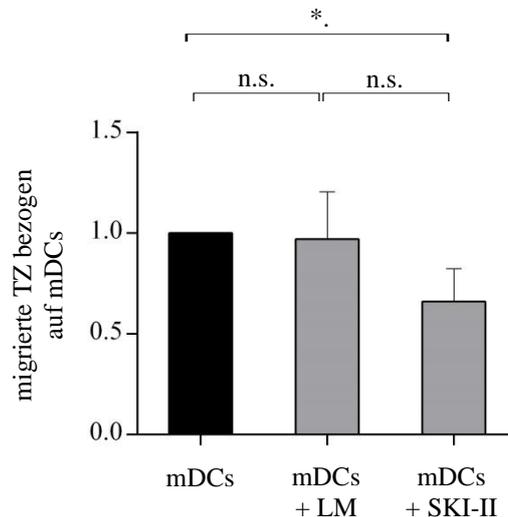


Abbildung 38: Effekt einer SKI-II Behandlung auf das chemoattraktive Potenzial von mDCs. In Anwesenheit des Inhibitors ($10 \mu\text{M}$) wurden mDCs über 2 h präinkubiert. Der Transwell-Assay erfolgte ebenso in Anwesenheit von SKI-II im unteren Kompartiment. Mit Lösungsmittel- und unbehandelten mDCs wurde ebenso verfahren. Dargestellt ist die Anzahl der migrierten T-Zellen in Bezug auf unbehandelte mDCs. $n = 5$. $*p < 0,05$.

Der Transwell-Assay erfolgte in Anwesenheit des Inhibitors, wodurch ein Einfluss auf die im oberen Kompartiment vorhandenen T-Zellen möglich war. Um diesen zu evaluieren, wurde unter denselben Bedingungen die Wirkung von SKI-II auf die durch SDF-1 α induzierte T-Zellchemotaxis untersucht. Der Transwell-Assay erfolgte analog zum vorherigen Versuch in Anwesenheit von SKI-II oder Lösungsmittel im unteren Kompartiment. Anstelle der mDCs wurde SDF-1 α eingesetzt. Hierbei war unter keiner der beiden Bedingungen ein zur Kontrolle (nur SDF-1 α) signifikanter Unterschied der SDF-1 α -abhängigen T-Zell-Chemotaxis zu sehen (Lösungsmittel: $p = 0,46$; SKI-II: $p = 0,92$), sodass eine Wirkung SKI-II auf allgemeine Mechanismen der T-Zellmigration ausgeschlossen werden konnte (Abb. 39).

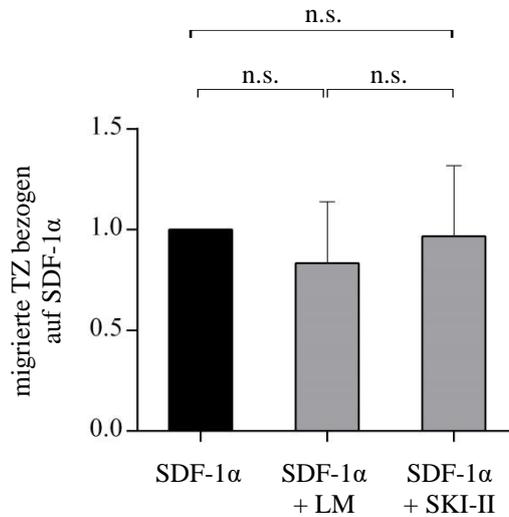


Abbildung 39: Auswirkungen von SKI-II auf die SDF-1 α -vermittelte T-Zellchemotaxis. In Anwesenheit des Inhibitors im unteren Kompartiment wurde im Transwell-Assay die Antwort von T-Zellen auf SDF-1 α analysiert. Daneben erfolgte der Transwell-Assay auch auf SDF-1 α ohne Zusätze und SDF-1 α mit Lösungsmittel. Dargestellt ist die Anzahl der migrierten T-Zellen in Bezug auf SDF-1 α ohne Zusätze. n = 3.

4.3.5 Bedeutung der Aktivität der SphK1 in DCs für das Migrationsverhalten primärer T-Zellen

Da die Ergebnisse aus Abschnitt 4.3.4 keine eindeutigen Aussagen zum Wirkort des Inhibitors und damit zum Anteil der Sphingosinkinasen am chemoattraktiven Potenzial dendritischer Zellen zuließen, wurde die SphK1 nun gezielt in DCs unterdrückt.

Hierfür wurden DCs mit einer SphK1-siRNA bzw. Kontroll-siRNA (ctrl) transfiziert. Die Überprüfung der Reduktion der mRNA-Expression erfolgte über RT-PCR und anschließender Densitometrie. Die residuale Expression der SphK1-spezifischen mRNA lag bei $50,2 \pm 25,8$ %.

Nach erfolgreicher Transfektion folgte die Ausreifung der DCs nach den beschriebenen Protokollen. Wie durchflusszytometrisch ermittelt, war eine hohe Expression von CD86 bereits ohne LPS-Behandlung (iDCs) unabhängig vom Einsatz von SphK1- oder ctrl-

siRNA messbar (Abb. 40), weshalb die Einleitung eines unspezifischen Reifungsprozesses alleine durch die Transfektionsreagenzien selbst anzunehmen ist.

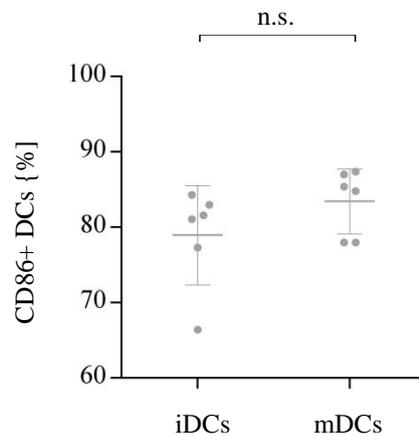


Abbildung 40: Durchflusszytometrische Analyse transfizierter DCs. Zellen wurden mit SphK1-siRNA (SphK1 KD) bzw. Kontroll-siRNA (ctrl) transfiziert und anschließend mittels LPS oder TNF- α , PGE₂, IL-1 β und IL-6 β ausgereift. 24 h später erfolgte die Färbung der DCs mit einem CD86-Antikörper. Als CD86-positiv galten Zellen, die durchflusszytometrisch höhere Intensitäten als der Isotyp aufwiesen. Dargestellt ist die Anzahl CD86-positiver iDCs und mDCs unabhängig von der gewählten siRNA. n = 3.

Um zu untersuchen, ob sich die Reduktion der Expression der SphK1 in mDCs auf deren chemoattraktives Potenzial auswirkte, wurden im Transwell-Assay ctrl-siRNA- und SphK1-siRNA-transfizierte mDCs verglichen. Wie in Abbildung 41 zu sehen, konnte hierbei kein Unterschied detektiert werden ($p = 0,75$). Demnach induzierten mDCs mit verminderter SphK1-Expression T-Zellchemotaxis quantitativ im selben Maße wie Kontrollzellen.

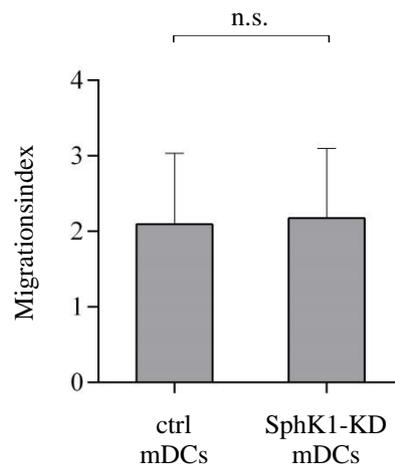


Abbildung 41: T-Zellchemotaxis nach Transfektion von DCs mit SphK1-siRNA. DCs wurden mit SphK1-siRNA (SphK1-KD) bzw. Kontroll-siRNA (ctrl) transfiziert und ausgereift. Ihr chemoattraktives Potenzial auf T-Zellen wurde im Transwell-Assay untersucht. Dargestellt sind die Migrationsindices. n = 3.

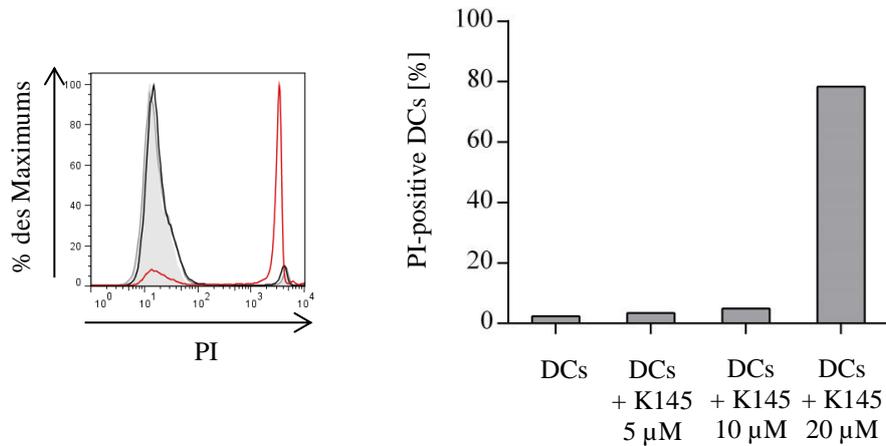
4.3.6 Einfluss des SphK2-Inhibitors K145 auf die Migration primärer T-Zellen in Antwort auf mDCs

Um eine Aussage über die Rolle der SphK2 treffen zu können, wurde diese im Folgenden mittels K145 gehemmt. Während SKI-II sowohl auf die SphK1 als auch auf die SphK2 wirkt, ist der Inhibitor K145 spezifisch für die SphK2.

4.3.6.1 Wirkung des SphK2-Inhibitors K145 auf die Zellviabilität

Analog zu der Untersuchung von SKI-II wurde der Inhibitor zunächst 5 h nach seiner Applikation in Konzentrationen von 5 μ M, 10 μ M und 20 μ M an einer Mischpopulation von DCs und T-Zellen auf Zytotoxizität geprüft. Es zeigte sich, dass nur in der höchsten Konzentration die Viabilität von sowohl T- als auch dendritischen Zellen signifikant beeinträchtigt war (Abb. 42), weshalb für nachfolgende Experimente Konzentrationen unter 20 μ M gewählt wurden.

A



B

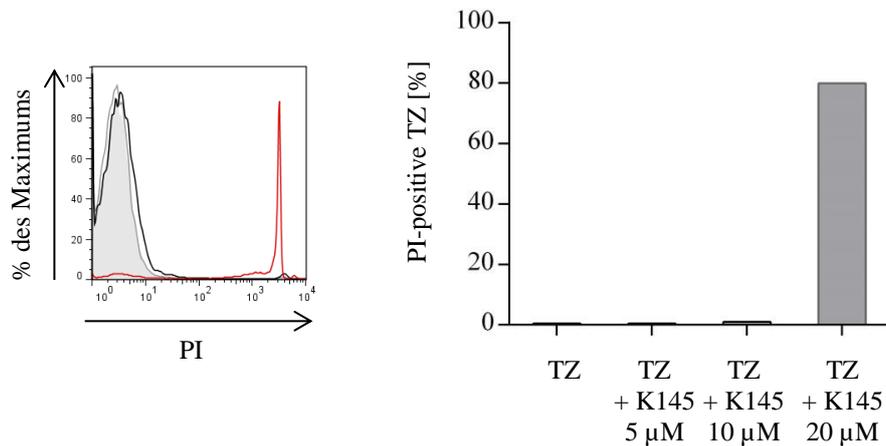


Abbildung 42: Prüfung von K145 auf Zytotoxizität. DCs und T-Zellen wurden 5 h lang in Anwesenheit des Inhibitor K145 inkubiert, sowie als Kontrolle unbehandelt belassen (hellgraue Füllung). Dabei wurden Konzentrationen von 5 μ M (graue Linie), 10 μ M (schwarz Linie) und 20 μ M (rote Linie) eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse in Form eines Histogramms und die Veränderungen in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle sowohl bei DCs (A) als auch bei T-Zellen (B).

4.3.6.2 Einfluss des Inhibitors K145 auf die T-Zellchemotaxis

Um den Effekt von K145 auf die T-Zellchemotaxis zu untersuchen, wurden mDCs 2 h vor Beginn des Transwell-Assays mit Inhibitor (oder Lösungsmittel) inkubiert. Eingesetzt wurde der Inhibitor mit einer Konzentration von 10 μ M, bei einem Spender zusätzlich mit 5 μ M. Dadurch konnten mögliche dosisabhängige Effekte überprüft

werden. Inhibitor-behandelte mDCs induzierten T-Zellchemotaxis zwar in geringerem Ausmaß als unbehandelte mDCs, die Reduktion um $83,0\% \pm 11,3\%$ war jedoch nicht signifikant ($p = 0,12$). Beim einmaligen Einsatz einer Konzentration von $5\ \mu\text{M}$ zeigte sich eine Dosisabhängigkeit. Die Behandlung mit $5\ \mu\text{M}$ K145 führte zu einer geringeren Reduktion der T-Zellchemotaxis als diejenige mit $10\ \mu\text{M}$.

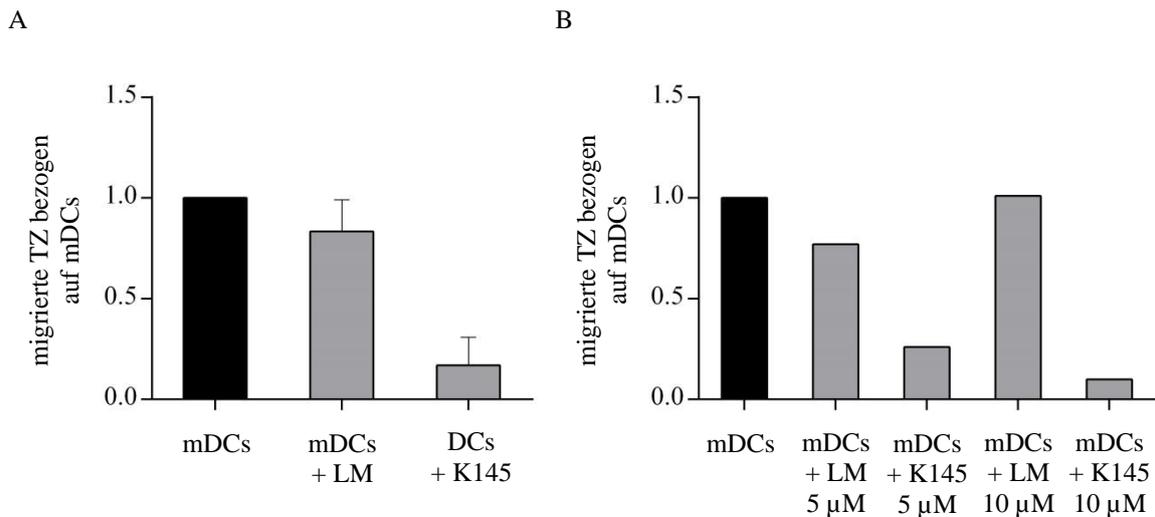


Abbildung 43: Effekt von K145 auf das chemoattraktive Potenzial von mDCs. In Anwesenheit des Inhibitors im unteren Kompartiment wurden mDCs über 2 h präinkubiert und der Transwell-Assay durchgeführt. Die Lösungsmittelkontrolle wurde dabei passend zur eingesetzten Konzentration gewählt. Diese betrug $10\ \mu\text{M}$ (A) und bei einer Probe zur Überprüfung auf Dosisabhängigkeit der Wirkung zusätzlich $5\ \mu\text{M}$ (B). Dargestellt ist die Anzahl der migrierten T-Zellen in Bezug auf unbehandelte mDCs. $n = 3$.

Wie für SKI-II bestand die Möglichkeit, dass K145 auch auf die allgemeine Migrationsfähigkeit von T-Zellen wirkte, weshalb ein mDCs-unabhängiger Effekt des Inhibitors mittels SDF-1 α -induzierter Chemotaxis getestet wurde. In Abbildung 44 ist eine Reduktion der migrierten T-Zellen im Vergleich zu reinem SDF-1 α bereits bei der Lösungsmittelkontrolle zu erkennen. Die Zugabe von K145 führte zu einer noch deutlicheren Reduktion um nahezu 90%. So wirkte der SphK2 Inhibitor im Gegensatz zu SKI-II auch auf die SDF-1 α -induzierte Migrationsfähigkeit von T-Zellen.

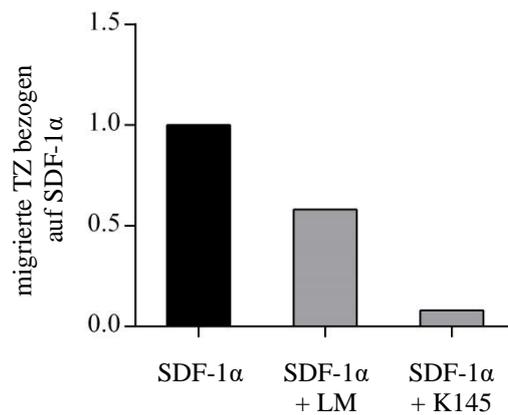


Abbildung 44: Effekt von K145 auf die SDF-1 α -vermittelte T-Zellchemotaxis. In Anwesenheit des Inhibitors (10 μ M) im unteren Kompartiment wurde im Transwell-Assay die Antwort von T-Zellen auf SDF-1 α analysiert. Die Kontrollen beinhalteten Ansätze mit SDF-1 α und Lösungsmittelzugabe, sowie ohne Zusatz. Dargestellt ist die Anzahl der migrierten T-Zellen in Bezug auf SDF-1 α ohne Zusätze. n = 1.

4.3.7 Bedeutung der SphK2-Aktivität in DCs für das Migrationsverhalten primärer T-Zellen

Da in Analogie zu den Untersuchungen mittels SKI-II auch die bisherigen Ergebnisse zur Bedeutung der SphK2 in DCs keine eindeutige Aussage zuließen, wurde im Folgenden mittels siRNA-Transfektion gezielt die SphK2 in DCs adressiert und somit ein möglicher Effekt der SphK2-Inhibition in T-Zellen umgangen.

Hierzu wurden DCs mit SphK2-siRNA transfiziert, woraufhin die residuale Expression der SphK2-spezifischen mRNA bei $47,0 \pm 15,6$ % lag.

Wie in Abbildung 45 zu sehen, unterschieden sich iDCs und mDCs nach dem Transfektionsvorgang hinsichtlich ihrer CD86-Expression nicht ($p = 0,14$). Die eingesetzte siRNA (ctrl- versus SphK2-siRNA) hatte dabei keine Bedeutung. Aufgrund der hohen Oberflächenexpression des Reifungsmarkers im Vergleich zu Isotyp-Färbungen scheint die Transfektion selbst, wie in Abschnitt 4.3.5 beschrieben, einen Reifungsprozess zu initiieren.

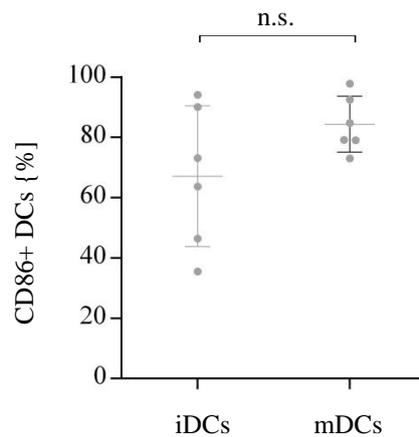


Abbildung 45: Durchflusszytometrische Analyse der CD86-Oberflächenexpression in transfizierten DCs. Zellen wurden mit SphK2-siRNA bzw. ctrl-siRNA transfiziert und anschließend mittels LPS oder TNF- α , PGE₂, IL-1 β und IL-6 β ausgereift. 24 h später wurden sie mit CD86-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Anzahl CD86-positiver iDCs und mDCs unabhängig von der gewählten siRNA. n = 3.

Die Induktion der T-Zellchemotaxis erfolgte im Transwell-Assay mit ctrl-siRNA- und SphK2-siRNA-transfizierten mDCs. Die Transfektion mit SphK2-siRNA führte zu keiner signifikanten Reduktion des Migrationsindex ($p = 0,75$) (Abb. 46).

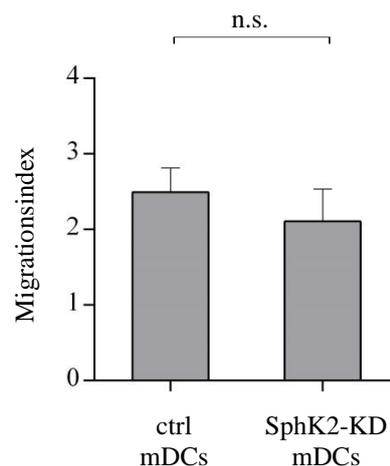


Abbildung 46: Auswirkungen einer Transfektion mit SphK2-siRNA auf das chemoattraktive Potenzial dendritischer Zellen. DCs wurden mit SphK2-siRNA (SphK2-KD) bzw. ctrl-siRNA transfiziert, anschließend ausgereift und als Induktoren für die T-Zellchemotaxis im Transwell-Assay eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse als Migrationsindices. n = 3.

5. Diskussion

Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Effizienz der MV-Infektion deutlich von der Interaktion mit Sphingolipiden abhängt und die Induktion einer adaptiven Immunantwort durch eine MV-vermittelte Dysregulation des Sphingolipidmetabolismus gestört werden kann (Mueller et al. 2014; Avota et al. 2011; Gassert et al. 2009). DCs sind in diese Prozesse maßgeblich involviert, da sie primäre Zielzellen des MV darstellen, die Virusdissemination fördern und gleichzeitig die Induktion der adaptiven Immunantwort vermitteln. Angesichts dieser pathogenetischen Relevanz wurde in der vorliegenden Arbeit der Beitrag S1Ps auf die Funktionalität dendritischer Zellen untersucht und mit weiteren inflammatorischen Bedingungen verglichen.

5.1 Vorkommen von S1P in humanen DCs

Die Bedeutung S1Ps für zahlreiche (patho)physiologische Prozesse ist intensiv beforscht (Spiegel und Milstien 2011), ebenso dessen Konzentration und Kompartimentierung innerhalb des Körpers (Dixit et al. 2019). Früh wurde der hohe S1P-Gehalt im Blut festgestellt, der im Wesentlichen durch die kontinuierliche Sekretion durch Erythrozyten aufrechterhalten wird (Hanel et al. 2007). Bekannte temporärer Schwankungen im Blut entstehen beispielsweise im Rahmen der Thrombozytenaggregation, wo S1P durch Thrombozyten, oder in Antwort auf Scherkräfte, wo S1P durch Endothelzellen abgegeben wird (Venkataraman et al. 2008; Jonnalagadda et al. 2014). Weniger klar ist die Verteilung in anderen Kompartimenten. Das komplexe Gleichgewicht des S1P-Metabolismus und die ubiquitäre Expression der involvierten Enzyme verkomplizieren Aussagen zum S1P-Vorkommen. Durch direkte Lipidmessungen und verschiedene indirekte Methoden ist es dennoch möglich, S1P-Gradienten in lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben zu detektieren. Eine zellspezifische Regulation der S1P-Synthese liegt nahe (Dixit et al. 2019).

DCs wurden als wesentlich für das Aufrechterhalten niedriger S1P-Konzentrationen innerhalb des Thymus beschrieben, wobei sie S1P-Lyase vermittelt extrazelluläres S1P regulierten (Zamora-Pineda et al. 2016). Unklar ist ihr Einfluss in anderen lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben, sowie ihre Kapazität, selbst S1P zu produzieren. Insbesondere im humanen System ist die Untersuchung zellulärer S1P-Quellen notwendig, da bisherige Daten meist auf Tiermodellen beruhen und speziell das murine System Unterschiede im S1P-Metabolismus aufweist (Ksiazek et al. 2015; Dahm et al. 2006).

In humanen peripheren Leukozyten wurde S1P nachgewiesen (Dahm et al. 2006). Dabei erfolgte keine weitere Auftrennung nach Zelltypen. Jedoch machte eine beschriebene Expression der SphK1 in humanen DCs diese als S1P-Quellen wahrscheinlich (Eigenbrod et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde in iDCs die Expression S1P-metabolisierender Enzyme, hierbei erstmalig neben der SphK1 auch die SphK2, und ein im Vergleich zu Erythrozyten hohes intrazelluläres Vorkommen an S1P nachgewiesen (Abb. 25, Abb. 14). Eine kontinuierliche Produktion S1Ps liegt damit nahe. Erstaunlicherweise stimmen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte mit $3,00 \pm 1,32$ pmol in 1×10^6 humanen iDCs mit für murine iDCs publizierten überein (Schwiebs et al. 2016). In Anbetracht der Vergleichbarkeit der für S1P und dessen Vorläufer Sphingosin gemessenen Werte ist eine spezielle Speicherfunktion für S1P in DCs nicht anzunehmen. Betrachtet man dahingegen den S1P-Gehalt in Erythrozyten in Relation zu derer geringen Zellgröße, zu ihrem großen Vorkommen im Blut und zum vergleichsweise niedrigen Gehalt an Sphingosin, wird die erythrozytäre Speicherkapazität für S1P deutlich (Abb. 14). Diese ist allgemein anerkannt (Hanel et al. 2007).

5.1.1 Einfluss einer Ausreifung auf den S1P-Status dendritischer Zellen

Der belegte pathogenetische Beitrag S1Ps bei chronisch entzündlichen und infektiösen Erkrankungen (Proia und Hla 2015), sowie ein verstärkter SphK1-Nachweis in inflammatorischem Gewebe (Jaigirdar et al. 2017) machen Untersuchungen zum S1P-Metabolismus in mDCs interessant. Die Ausreifung von DCs erfolgt in der Regel in Antwort auf Pathogen-Erkennung (*in vitro* wie auch in dieser Arbeit durch LPS-

Behandlung dargestellt) oder Entzündungsmediatoren (in dieser Arbeit durch TNF- α mit PGE₂, IL-1 β und IL-6 β dargestellt) (Abb. 15).

In der Literatur finden sich zum Einfluss von LPS auf die S1P-Produktion unterschiedliche Beobachtungen: Einer vermehrten Synthese in murinen Splenozyten (Schroder et al. 2011) steht eine Verminderung des S1P-Gehalts in murinen DCs nach LPS-Stimulation gegenüber (Schwiebs et al. 2016). In Splenozyten erfolgte die LPS-abhängige Regulation durch SphK1 und SphK2, deren mRNA-Expression nach 2 h bzw. Aktivität nach 14 h zunahm. Die murinen DCs zeigten eine LPS-abhängige Reduktion des S1P-Gehalts im langfristigen Verlauf. Nach 4 h wiesen sie zudem eine hyperaktive Phase mit kurzfristigem S1P-Anstieg auf. In SphK1-depletierten Mäusen unterblieb dieser initiale Anstieg, die Abnahme des S1P-Pools zu späteren Zeitpunkten bis nach 48 h war vergleichbar mit den wildtypischen DCs. Damit war nach LPS-Stimulation die kurzfristige Zunahme, nicht aber die Abnahme des S1P-Pools SphK1-abhängig (Schwiebs et al. 2016). Wie auch für LPS wurden für die Stimulation mittels TNF- α in verschiedenen Zelltypen SphK1-abhängige Signalwege identifiziert. Dabei wirkte es als SphK-Aktivator unter anderem in HEK-Zellen, einer Endothelzelllinie und in glatten Muskelzellen (Pitson et al. 2003; Palma et al. 2006; Scherer et al. 2010). In humanen DCs hingegen wurde nach Ausreifung mittels TNF- α semiquantitativ eine verminderte SphK1-Expression ermittelt (Eigenbrod et al. 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit induzierten beide Stimuli (LPS und proinflammatorische Zytokine) nach 24 h eine Reduktion des S1P-Gehalts, deren Ausmaß unabhängig vom jeweiligen Ausreifungsprotokoll war (Abb. 16). Dies bestätigt die oben beschriebenen langfristigen Beobachtungen in LPS-ausgereiften murinen DCs (Schwiebs et al. 2016), und könnte eine verminderte SphK1-Expression in TNF- α -ausgereiften humanen DCs reflektieren (Eigenbrod et al. 2006), die sich jedoch auf mRNA-Ebene nicht nachweisen ließ. Ebenso zeigte sich die mRNA-Menge der SphK2 und SPL 24 h nach Ausreifung unverändert (Abb. 25), ihre Enzymaktivität wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Eine Modulation anderer Enzyme des S1P-Metabolismus als Ursache des verringerten S1P-Gehalts in mDCs wurde mit der Messung der Sphingomyelinaseaktivität (Abb. 20) und der Bestimmung der S1P-Vorläufer (Abb. 22) unwahrscheinlich. Alternativ kann die intrazelluläre S1P-

Konzentration über die Aufnahme aus der Umgebung oder über Sekretion reguliert werden. Dies spielt zum Beispiel beim S1P-Speicheraufbau in Erythrozyten eine bedeutende Rolle (Hanel et al. 2007). Bei den ausgeführten Ergebnissen in DCs wäre eine vermehrte Sekretion nach Ausreifung als ein Mechanismus zur Reduktion des intrazellulären S1Ps denkbar. Der S1P-Gehalt in DC-Überständen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgrund Limitationen der Nachweismethodik nicht bestimmt werden. Das Expressionsniveau des S1P₁ kann als Surrogatmarker für extrazelluläres S1P betrachtet werden, da hohe extrazelluläre S1P-Konzentrationen Internalisierung induzieren (Liu et al. 1999). Mit Hilfe dieser spezifischen Regulation wurde die S1P-Verteilung in der murinen Milz beschrieben (Ramos-Perez et al. 2015). In Anlehnung an diese Publikation wurde in der vorliegenden Arbeit die durchflusszytometrisch gemessene Kinetik der Oberflächenexpression von S1P₁ als Indikator des extrazellulären S1Ps und damit dessen Sekretion gewertet. Es ergaben sich keine Hinweise auf eine reduzierte Oberflächenexpression des S1P₁ nach Ausreifung (Abb. 19), wodurch erhöhte S1P-Sekretion als Mechanismus nicht wahrscheinlich ist. Dies könnte durch Messungen des extrazellulären S1P-Gehaltes, was heute nach Verbesserung der Nachweismethodik möglich ist, erhärtet werden. In Anbetracht der ausgeführten Überlegungen ist unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine Regulation der direkten S1P-metabolisierenden Enzyme auf translationaler oder Aktivitätsebene mit folgender Reduktion des S1P-Gehaltes in mDCs anzunehmen.

5.1.2 Einfluss einer MV-Infektion auf den S1P-Status dendritischer Zellen

Für andere (nicht LPS-vermittelte) Infektionsgeschehen ist eine Bedeutung von S1P bzw. der SphK1 bekannt (Arish et al. 2016). Die Auswirkung auf die Aktivität der SphK1 ist dabei erregerspezifisch. Eine Hemmung der SphK1 wirkt sich positiv auf das intrazelluläre Überleben des *Mycobacterium tuberculosis* in Makrophagen aus (Malik et al. 2003), sowie auf die Replikation des Erregers der bovinen Virusdiarrhoe (Yamane et al. 2009). Im Gegensatz dazu steht der positive Einfluss der SphK1 auf die Replikationseffizienz des MV in Lymphoblasten einer Affenzelllinie (B95-8) (Vijayan et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde der S1P-Metabolismus MV-infizierter DCs dem der „klassisch“ ausgereiften DCs gegenübergestellt (Abb. 18). Die Ausreifung über

Pathogen-Erkennung (LPS) bzw. über inflammatorische Zytokine (TNF- α mit PGE₂, IL-1 β und IL-6 β) resultierte in einer Reduktion des intrazellulären S1P-Gehalts. Eine MV-Infektion, die ebenfalls eine phänotypische DC-Reifung induziert (Verhasselt et al. 1997; Cella et al. 1997; Klagge et al. 2000), induzierte diese Reduktion nicht. In MV-hoch-infizierten DC-Kulturen konnte vielmehr eine Retention eines den iDCs vergleichbaren S1P-Spiegels beobachtet werden (Abb. 18). Die Retention des S1P mag neben der im Vergleich zur LPS-Reifung weniger effizienten Hochregulation von CD86 (Abb. 17), inflammatorischer Zytokine und Chemokin-Rezeptoren, sowie der eingeschränkten Befähigung zur Konjugatbildung mit T-Zellen einen weiteren Parameter der durch MV-induzierten inkompletten DC-Reifung repräsentieren (Schnorr et al. 1997; Abt 2006; Abt et al. 2009; Shishkova et al. 2007).

Ebenso wie nach Ausreifung mittels LPS oder inflammatorischer Zytokine induzierte die MV-Infektion nach 24 h weder die Sphingomyelinasenaktivität (Abb. 20), noch erhöhte Spiegel der S1P-Vorläufer (Abb. 22). Eine intrazelluläre S1P-Retention infolge verminderter Sekretion nach MV-Infektion erschien unwahrscheinlich, da eine zu erwartende Hochregulation der Oberflächenexpression von S1P₁ ausblieb (Abb. 19). Damit ist eine MV-abhängige Regulation der direkten S1P-metabolisierenden Enzyme (SphK1, SphK2, SPL) anzunehmen. Die in der Arbeit von Vijayan beschriebene MV-induzierte SphK1-Expression in B95-8-Zellen (Vijayan et al. 2014) konnte in humanen MV-infizierten DCs nicht gezeigt werden, es zeigten sich auch keine Veränderungen der Akkumulation SphK2- und SPL-spezifischer mRNAs (Abb. 25). Da in humanen bronchioalveolären Krebszellen (H358) ebenfalls keine MV-induzierte SphK1-Expression nachweisbar war, ist eine zellspezifische Regulation des S1P-Metabolismus durch MV wahrscheinlich. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Regulation der direkten S1P-metabolisierenden Enzyme auf translationaler oder Aktivitätsebene in DCs nicht adressiert, sollten aber Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

5.1.3 Einfluss einer Ausreifung oder MV-Infektion auf weitere Sphingolipide

In chronisch entzündlichen und infektiösen Erkrankungen spielen Sphingolipide eine wichtige Rolle (Hanada 2005; Maceyka und Spiegel 2014). Als Membrankomponenten können sie den Eintritt bakterieller und viraler Pathogene in die Zelle regulieren. Beispielsweise nutzt HIV neben seinen Proteinrezeptoren Glykosphingolipide als

Eintrittspforten (Yahi et al. 1992). Glykosphingolipide vermitteln zudem die Endozytose des Influenzavirus (Suzuki 1994). Die Sphingolipid-abhängige Interaktion mit der Wirtsmembran kann durch Signale des Erregers gefördert werden, wie es bei der Ceramid Anreicherung der Membran durch Rhino- und Masernviren (Dreschers et al. 2007; Avota et al. 2011), *Neisseria gonorrhoeae* und *meningitidis* (Grassme et al. 1997; Simonis et al. 2014) sowie *Clostridium perfringens* (Ochi et al. 2004) beobachtet wurde.

In DCs ist beschrieben, dass TNF- α , IL-1 β sowie LPS (in hoher Konzentration: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) über ihre respektiven Rezeptoren eine Akkumulation von Ceramid induzieren können (Sallusto et al. 1996; Falcone et al. 2004). Eine DC-SIGN-assoziierte ASM- und NSM-Aktivierung mit erhöhtem Ceramid-Spiegel wurde in DCs innerhalb von Minuten auch nach MV-Kontakt beobachtet (Avota et al. 2011). Es blieb unklar, ob die MV-Infektion der Zellen längerfristig die Akkumulation von Sphingolipidspezies beeinflusst. Aufgrund ihrer Bioaktivität hat eine solche Gleichgewichtsverschiebung der Sphingolipide funktionelle Konsequenzen: Ceramid und Sphingosin hemmen Zellproliferation und fördern Apoptose, während S1P vor allem anti-apoptotische Vorgänge reguliert und Ceramid-vermittelte Apoptose antagonisiert (Cuvillier et al. 1996; Taha et al. 2006; Qi et al. 2015).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war im späteren Verlauf der MV-Infektion keine erneute Akkumulation von Ceramid nach Ausreifung mittels LPS bzw. inflammatorischer Zytokine oder MV-Kontakt zu erkennen (Abb. 22). Die Beschränkung der Differenzen zwischen mDCs und MV-infizierten DCs auf S1P (Abb. 22) ist jedoch insbesondere bemerkenswert, da durch die Ko-Modulation anaboler und kataboler Reaktionen Veränderungen weiterer Sphingolipidmetaboliten zu erwarten wären.

Nicht nur die Quantität des Ceramids, sondern vielmehr die Zusammensetzung an Fettsäuren wurde als entscheidender Faktor für dessen Aktivität identifiziert (Hartmann et al. 2012; Hartmann et al. 2013): Überexpression spezifischer Synthetasen zeigte dabei den proliferationsfördernden Charakter sehr langkettiger und den pro-apoptotische Effekt langkettiger Ceramide bei Kolon- und Mammakarzinomzellen (Hartmann et al. 2012), während bei Plattenepithelkarzinomzellen gegenteilige Effekte beschrieben sind (Senkal et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit veränderte sich der Anteil sehr lang-

(C22, C24, C24:1) und langkettiger Fettsäuren (C16) am Gesamtceramidpool nachhaltig zugunsten der langkettigen Fettsäuren nach Ausreifung der DCs, nicht jedoch nach MV-Infektion (Abb. 24). Unklar bleibt die Auswirkung dieser Diskrepanz, da der Einfluss der Kettenlänge auf das Überleben möglicherweise zelltyp-abhängig und für humane DCs bisher nicht definiert ist.

5.1.4 Wirkungsort und mögliche Funktion des intrazellulär gebildeten S1Ps

Das detektierte S1P kann sowohl als intrazellulärer als auch als extrazellulärer Mediator agieren. Eine kontinuierliche Sekretion intrazellulär produzierten S1Ps mithilfe des Transporters ABCC1 wurde für murine DCs beschrieben (Japtok et al. 2012). In humanen DCs sind die sekretorischen Komponenten und involvierten Transporter bisher nicht beschrieben.

Anhand des Surrogatmarkers S1P₁ wurde in der vorliegenden Arbeit extrazelluläres S1P und damit dessen Sekretion beurteilt (siehe Abschnitt 5.1.1). Hier zeigte sich, dass nach LPS-Ausreifung S1P₁ hochreguliert wurde, was eine reifungsbedingt erniedrigte S1P-Sekretion abbilden könnte. In MV-infizierten DC-Kulturen entsprach das Expressionsniveau des S1P₁ dem der iDCs, was eine Ähnlichkeit deren extrazellulären S1P-Konzentrationen implizieren könnte (Abb. 19, Abb. 18). Alternativ ist es möglich, eine Sekretion des produzierten S1Ps anhand des involvierten Enzyms nachzuweisen. SphK1-abhängig generiertes S1P wird sezerniert, SphK2-abhängig generiertes verbleibt meist intrazellulär (Adada et al. 2015). Kompartiment-spezifische Analysen der SphK-Aktivität wurden jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Ob über intrazelluläre oder autokrine Wirkung, der S1P-Pool kann wichtige Konsequenzen auf Zellvitalität (siehe Abschnitt 5.1.3) und Funktion der DC haben. So bewirkte die Stimulation der SphK1 eine verminderte Makropinozytose in murinen iDCs (Japtok et al. 2012), Hemmung der SphK1 eine verstärkte endozytische Aktivität in humanen iDCs (Eigenbrod et al. 2006). Die für mDCs beschriebene S1P-abhängige Regulation der Synthese inflammatorischer Zytokine legt dessen Einfluss auf die Qualität der Immunantwort nahe (Arlt et al. 2014; Schroder et al. 2011). *In vitro* korrelierte Anwesenheit von extrazellulärem S1P mit einer reduzierten IL-12-Synthese und -Ausschüttung (Jung et al. 2007; Schaper et al. 2014), was vor dem Hintergrund der

bekanntem verminderten IL-12-Produktion in MV-infizierten DC-Kulturen besonders interessant erscheint (Fugier-Vivier et al. 1997; Servet-Delprat et al. 2000; Atabani et al. 2001). Ob der höhere S1P-Gehalt in MV-infizierter DCs oder aber die Interferenz der MV-Interaktion mit der LPS-induzierten TLR4-Aktivierung (Avota et al. 2011) ursächlich für die reduzierte IL-12-Produktion ist, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. In der Arbeitsgruppe detektiert und publiziert ist die S1P-abhängige Migration MV-infizierter DCs in einem 3D-Modell des respiratorischen Epithels (Derakhshani et al. 2019). Dabei zeigte sich die gesteigerte amöboide Fortbewegung MV-infizierter DCs durch eine Inhibition der SphK1 oder der Rezeptoren S1P₁ und S1P₃ beeinträchtigt. Dies legt einen autokrin vermittelten Beitrag S1Ps zur MV-induzierten DC-Migration nahe und identifiziert S1P als wesentlichen Faktor einer erfolgreichen MV-Transmission.

Mögliche Wirkungen des intrazellulär gebildeten S1Ps, die nicht die DC selbst, sondern über den Aufbau eines lokalen S1P-Gradienten oder über parakrine Signaltransduktion weitere Zellen betreffen, sind bisher nicht identifiziert und wurden im zweiten Teil der Arbeit analysiert. Die bereits diskutierte Sekretion des S1Ps ist dabei Voraussetzung einer solchen Wirkung.

5.2 Bedeutung des S1Ps für die T-Zellchemotaxis in Antwort auf DCs

S1P ist in seiner Funktion als potenter T-Zellattraktant intensiv erforscht, S1P-Gradienten zwischen bzw. innerhalb von Kompartimenten im besonderen Maße an der Regulation lymphozytärer Migrationsvorgängen beteiligt (Simmons und Ishii 2014): Ein S1P-Gradient zwischen verschiedenen Geweben wurde als entscheidender Faktor zur Steuerung der Zirkulation von T-Zellen (Matloubian et al. 2004) sowie zur Retention von T-Zellen am Entzündungsfokus identifiziert (Ledgerwood et al. 2008; Jaigirdar et al. 2017). Der Aufbau eines S1P-Gradienten innerhalb eines Kompartiments war für den intrasplenalen Transport systemischer Antigene von Bedeutung (Cinamon et al. 2008). Daneben wurde die Möglichkeit einer Zellinteraktion durch lokales S1P anhand der Induktion einer S1P₁- und S1P₃-abhängigen T-Zellchemotaxis mittels Überständen aus stimulierten Thrombozyten gezeigt (Iino et al. 2014). Der Beitrag von

S1P zur Interaktion von T-Zellen und DCs ist bisher unklar. Wie 1999 von Tang und Cyster in einem biphasischen Modell beschrieben, gelangen sowohl T-Zellen als auch DCs in Antwort auf Chemokine in die T-Zellzone, dort erhöhen weitere Chemokine die Wahrscheinlichkeit eines Aufeinandertreffens von Antigen-spezifischer T-Zelle und Antigen-präsentierenden DC und ermöglichen so eine effiziente Interaktion (Tang und Cyster 1999).

5.2.1 mDCs-induzierte T-Zellmigration

Die T-Zell-chemotaktische Fähigkeit ausgereifter DCs, die auch in der vorliegenden Arbeit bei mDCs beobachtet wurde (Abb. 29), ist bereits bekannt (Tang und Cyster 1999; Abt et al. 2009). Im Gegensatz zu den mit konditionierten Überständen aus murinen bzw. humanen mDC-Kulturen erhaltenen beschriebenen Migrationsraten (10 % der eingesetzten T-Zellen im murinen, 20 - 40 % im humanen System (Tang und Cyster 1999; Abt et al. 2009)), migrierten in der vorliegenden Arbeit im Mittel lediglich 2,4 % der T-Zellen (Abb. 29). Die Gründe hierfür sind methodischer Natur und schließen die Wahl des Filters, die Anzahl eingesetzter DCs bzw. T-Zellen und die Quantifizierungsmethode ein. Letztere unterliegt, wie aus dem Ergebnisteil hervorgeht, deutlichen Schwankungen. Durchflusszytometrisches Messen der gesamten Probe oder eine Zählung über die Neubauer-Zählkammer erwies sich aufgrund der geringen Zellzahlen als zu ungenau, während sich die vorwiegend angewendete Quantifizierung mittels Counterbeads als besonders zuverlässig erwies.

Nach Bestätigung der Migration primärer T-Zellen in Antwort auf mDCs stellte sich die Frage, ob S1P hierzu einen Beitrag leiste.

Wie in Abschnitt 5.1 diskutiert wurde, ist die Sekretion des in DCs detektierten S1Ps wahrscheinlich und Voraussetzung zu dessen chemoattraktiver Wirkung. Für T-Zellen besteht eine direkte Korrelation zwischen Rezeptordichte und S1P-induzierter T-Zellmigration (Messias et al. 2016), eine verstärkte S1P₁-Sensitivität ist im Zusammenhang mit serumfreier Kultur beschrieben (Mudd et al. 2013). Diese ist wahrscheinlich durch erhöhte S1P₁-Oberflächenexpression in serumfreier (und damit S1P-depletierter) Kultur bedingt. Daraus ergab sich in der vorliegenden Arbeit initial der Hinweis auf einen Beitrag S1Ps zur mDCs-induzierten T-Zellchemotaxis, da die

serumfreie Kultur von T-Zellen zu einer erhöhten Expression von S1P₁ und gleichzeitig zu einer gesteigerten Migrationsfähigkeit führte (Abb. 34, Abb. 28). Die aufgeführten Ergebnisse waren jedoch aufgrund hoher interindividueller Schwankungen für eine statistische Korrelation zwischen S1P₁-Oberflächenexpression und mDCs-induzierter Chemotaxis nicht ausreichend (Abb. 34, Abb. 28), weshalb die Validität dieses Hinweises und eine daraus folgende mögliche Kausalität fraglich sind.

S1P-vermittelte lymphozytäre Migration erfolgt meist über S1P₁, wie anhand von mRNA-Messungen, Inhibitor-Analysen und Knockout-Modellen dokumentiert ist (Allende et al. 2010; Messias et al. 2016). Bei der durch mDCs induzierten T-Zellchemotaxis zeigte sich in der vorliegenden Arbeit keine Veränderung durch die Hemmung von S1P₁ und S1P₃ (Abb. 36), was einen Beitrag dieser Rezeptoren unwahrscheinlich macht. S1P₁ wurde insbesondere bei T-Zellen für ihre Rezirkulation, ihren Egress aus primären lymphatischen Organen und für die Thrombozyten-induzierte Migration (hier neben S1P₃) in seiner Bedeutung bestätigt (Matloubian et al. 2004; Iino et al. 2014). Prinzipiell ist jedoch auch eine Beteiligung der Rezeptoren S1P₂, S1P₄ und S1P₅ möglich. Für S1P₄ ist bislang keine Beteiligung an lymphozytären Migrationsprozessen beschrieben, während S1P₂ Einfluss auf die Retention von B-Zellen im Keimzentrum des Lymphknotens hat (Green et al. 2011) und S1P₅ NK-Zellen zum Entzündungsfokus mobilisiert (Walzer et al. 2007).

Eine rezeptorunabhängige Beurteilung des Beitrags S1Ps zur T-Zellchemotaxis ist über die Reduktion des S1P-Gehalts in DCs möglich. Eine Beteiligung der SphK1 wäre in diesem Zusammenhang naheliegend, da sie durch ihre aktivierungsbedingte Translokation zur Plasmamembran wesentlich zur Synthese von sekretorischem S1P beiträgt. Die erhobenen Daten unterstützen jedoch eine Rolle der SphK1 für das chemoattraktive Potenzial von mDCs nicht. So erwies sich die Abnahme der T-Zellchemotaxis durch den SphK-Inhibitor SKI-II als unspezifisch (Abb. 38) und die siRNA-vermittelte Ablation der SphK1 zeigte keinen Effekt auf die T-Zell-Attraktion (Abb. 41), wobei hier die methodisch erreichte Ablation von nur 50 % zu nennen ist. Die SphK2, die durch SKI-II ebenfalls unselektiv gehemmt wird, ist in der Lage, neben anderen Faktoren den intra- und extrazellulären S1P-Gehalt zu determinieren. Zwar lässt ihre Position in der unmittelbaren Umgebung des Nukleus oder anderer

intrazellulärer Kompartimente primär nicht erhöhte S1P-Sekretion vermuten, jedoch war in SphK2-Knockout-Modellen auch die S1P-Plasmakonzentration wesentlich reduziert (Kharel et al. 2005). Wie mittels spezifischer pharmakologischer (Inhibitor K145) und genetischer Interferenz (SphK2-siRNA) gezeigt wurde (Abb. 43, Abb. 46), scheint jedoch auch die SphK2 keinen Einfluss auf die T-Zell-Attraktion durch mDCs zu haben. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass unter den beschriebenen Versuchsbedingungen weder die SphK1 noch die SphK2 einen bedeutenden Beitrag zur T-Zellchemotaxis in Antwort auf mDCs leisten. Die zur Signaltransduktion erhobenen Befunde, nach denen weder über S1P₁ noch über S1P₃ die T-Zellchemotaxis vermittelt wurde, legen zusätzlich nahe, dass die in Abschnitt 1.4 aufgeführten Chemokine, nicht jedoch S1P für eine mDC-induzierte T-Zell-Chemotaxis relevant sind.

Chemotaxis ist ein hochsensibler Prozess. Schon geringe Konzentrationsschwankungen können sich auf die Effizienz der Chemotaxis auswirken bzw. zwischen Chemo- und Fugetaxis entscheiden. Eine zweistündige DC-Präinkubation könnte folglich nicht die optimale Dauer zur suffizienten S1P-Synthese sein, hinzu kommen interindividuelle Differenzen. Dass S1P keinen Beitrag zur mDCs-induzierten T-Zellchemotaxis leistet, ist somit als quantitative Aussage zur T-Zellchemotaxis unter den beschriebenen Versuchsbedingungen ohne Betrachtung einzelner Subpopulationen zu werten. Eine Prüfung auf Veränderungen des T-Zellsubset-Profiles aufgrund deren heterogenen Migrationsverhalten bleibt weiteren Arbeiten vorbehalten.

5.2.2 Betrachtung der mDCs- im Vergleich zur SDF-1 α -induzierten T-Zellchemotaxis

SDF-1 α ist hochpotentes Chemoattraktant für humane und murine Lymphozyten und Monozyten (Bleul et al. 1996) und erwies sich auch in der vorliegenden Arbeit erwartungsgemäß als starker Induktor der T-Zellchemotaxis (Abb. 30). Eine vergleichende Aussage hinsichtlich der chemoattraktiven Potenz von SDF-1 α und mDCs ist lediglich für die eingesetzte Konzentration bzw. Zellzahl zu treffen. Durch ihre hohe Direktionalität im 2-D System ist die mDCs- und SDF-1 α -induzierte T-Zellchemotaxis als gerichtete Bewegung anzusehen, deren Geschwindigkeit unter den gewählten Bedingungen für SDF-1 α höher lag als für mDCs (Abb. 31). Mittels dieser Untersuchungen ließ sich die vormals bestimmte Geschwindigkeit der T-Zellen von

2,2 μm / Minute auf SDF-1 α -Gradienten (Gassert 2011) nahezu numerisch exakt in der vorliegenden Arbeit reproduzieren (2,17 μm / Minute).

5.2.3 Einfluss der DC-Ausreifung oder MV-Infektion auf ihr chemoattraktives Potenzial

Für eine effiziente Immunantwort nach bakterieller oder viraler Infektion ist eine vermehrte Chemotaxis von Immunzellen zum Infektionsfokus, sowie eine Motilitätssteigerung aktivierter T-Zellen in sekundären lymphatischen Geweben notwendig. Die Modulation dieser Prozesse kann infektionsbedingt reguliert werden (Mudd et al. 2013), beispielsweise durch Veränderung der Chemokinexpression (Piqueras et al. 2006). Für iDCs, MV-infizierte und mDCs ist ein solches differentielles Chemokinprofil beschrieben (Abt et al. 2009). Quantitativ blieb die T-Zellmigration auf deren konditionierte Überstände davon jedoch unbeeinflusst, was sich in der vorliegenden Arbeit auch beim Einsetzen der DCs als Attraktoren zeigte (Abb. 32, Abb. 33). Da der Zusammenhang zwischen sezerniertem Chemokin-Profil und Effizienz bzw. Zusammensetzung der T-Zellmigration unklar ist, stehen diese Beobachtungen nicht im direkten Widerspruch. Heterogenes Migrationsverhalten verschiedener T-Zellsubpopulationen ist bekannt: Das Chemokin CCL-18 induziert vorwiegend die Migration naiver T-Zellen (Adema et al. 1997), CCL-5 die Chemotaxis CD4-positiver Gedächtniszellen, nicht jedoch CD8-positiver T-Zellen (Schall et al. 1990). Gemeinsam mit dem aufgeführten differentiellen Chemokinprofil macht dies Veränderungen des T-Zell-Subsetprofils bei Ausreifung oder MV-Infektion der DCs wahrscheinlich.

5.2.4 Beeinflussung der Migrationsfähigkeit von T-Zellen durch die SphK

Unabhängig seiner chemotaktischen Wirkung reguliert S1P Migrationsprozesse. In murinen Fibroblasten, in Mastzellen und in HEK-Zellen moduliert die SphK1 bzw. in HEK-Zellen auch die SphK2 deren Migration in Abhängigkeit von Chemokin und Zelltyp (Hobson et al. 2001; Jolly et al. 2004; Hait et al. 2005). In einer weiteren Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen der SphK2-vermittelte Migration nach EGF-Stimulation und der Phosphorylierung der Ezrin-Radixin-Moesin-Proteine (ERM) hergestellt (Adada et al. 2015), was eine nachfolgende Ausbildung von Filopodien und Migration ermöglicht. Wie bereits in Abschnitt 5.1.3 dargestellt, ist auch die amöboide

Fortbewegung MV-infizierter DCs sensibel auf eine Hemmung der SphK1 (Derakhshani et al. 2019). Die Signaltransduktion erfolgt wahrscheinlich über S1P₁ mit nachfolgender Umstrukturierung des F-Aktins, wie es in murinen mesenchymalen Zellen bereits gezeigt wurde (Sassoli et al. 2018).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen auch für primäre T-Zellen eine mögliche Migrationsmodulation durch S1P. In Anwesenheit des SphK2-Inhibitors K145 wurde, wenn auch nicht signifikant, die T-Zellmigration unabhängig vom chemotaktischen Stimulus behindert (Abb. 43, Abb. 44). Bei der mDCs-induzierten Chemotaxis zeichnete sich eine dosisabhängige Wirkung ab (Abb. 43). Die unselektive Hemmung mittels SKI-II konnte dies nicht bestätigen (Abb. 38, Abb. 39). Diese Daten machen eine Bedeutung der SphK2, nicht aber der SphK1, für die Migrationsfähigkeit der T-Zellen denkbar, was jedoch zunächst in einer größeren Probenzahl zu prüfen ist.

6. Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DCs) sind als Zielzellen des MV für dessen Pathogenese von zentraler Bedeutung und fördern sowohl Dissemination und Transmission des Virus. Auf zellulärer Ebene findet sich eine Modulation des Sphingolipidmetabolismus in MV-infizierten DC-Kulturen. S1P selbst ist ein bioaktives Sphingolipid, das über auto- und parakrine S1P-Rezeptorstimulation Funktion, Migration und Positionierung von Immunzellen, aber auch als intrazellulärer Botenstoff Calcium-Haushalt, Apoptose und Proliferation reguliert. Über die an der Vermittlung der intrazellulären S1P-Effekte beteiligten Strukturen ist bisher weniger bekannt und der S1P-Metabolismus einzelner Zellen trotz Kompartiment-abhängiger Schwankungen der S1P-Konzentrationen kaum adressiert. Für murine DCs konnte eine kontinuierliche S1P-Produktion und -Sekretion nachgewiesen werden. Ob dies auch auf humane DCs zutrifft und pathophysiologisch im Rahmen einer MV-Infektion moduliert wird, ist bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde das Vorkommen S1Ps sowie dessen Metabolismus in humanen DCs quantitativ erfasst, und der Einfluss inflammatorischer, bakterieller und viraler (MV) Stimuli einbezogen. In Anbetracht der bekannten chemoattraktiven Potenz wurde nachfolgend der Beitrag S1Ps für die DC-induzierte T-Zellmigration untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass beide SphK-Isoenzyme und auch die irreversibel degradierende SPL in humanen unreifen DCs (iDCs) auf mRNA-Ebene exprimiert werden. S1P konnte intrazellulär nachgewiesen werden, eine mit Erythrozyten vergleichbare Speicherkapazität ist nicht anzunehmen. Unter bakteriell oder inflammatorisch vermittelter Ausreifung (mDCs) wurde eine Reduktion des S1P-Gehalts in DCs beobachtet. Abweichend davon behielten insbesondere stark MV-infizierte DC-Kulturen die hohen S1P-Spiegel unreifer DCs bei, was möglicherweise neben der modulierten Chemokinsynthese und Oberflächenexpression ko-stimulatorischer Moleküle einen weiteren Parameter ihrer inkompletten Reifung nach MV-Infektion reflektiert. Da die Veränderungen zwischen MV-infizierten DCs und mDCs nur für S1P, nicht aber für andere Sphingolipidmetaboliten messbar waren, liegt ihnen wohl eine Regulation der Sphingosinkinasen oder S1P-degradierender

Enzyme zugrunde. Bei unveränderter Akkumulation der hierfür spezifischen mRNAs müsste dies auf Ebene der Translation, Stabilität oder Aktivität der Enzyme beruhen.

Die indirekte Messung des extrazellulären S1Ps anhand der gegenläufigen S1P₁-Dichte ließ vermuten, dass in DCs synthetisiertes S1P extrazellulär wirken konnte. Es kann dabei autokrin auf DCs wirken, beispielsweise deren Motilität oder Genexpression regulieren, ist aber auch Voraussetzung zum Aufbau eines S1P-Gradienten und damit parakriner Regulation lymphozytärer Migrationsvorgänge. Einen Beitrag S1Ps zur mDCs-induzierten T-Zellchemotaxis konnte durch die erhobenen Daten mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Bezüglich der durch iDCs oder MV-infizierte DCs induzierten T-Zellchemotaxis konnte aufgrund experimenteller Limitationen keine abschließende Aussage zur Beteiligung S1Ps getroffen werden. Die T-Zellmigration auf DCs erwies sich im 2-D-System als gerichtete Bewegung. Weder Ausreifung noch MV-Infektion der DCs hatten Auswirkungen auf die Quantität der T-Zellmigration. Differentielle Expressionsmuster von Chemokinen in iDCs, mDCs und MV-infizierten DCs sind jedoch bekannt und legen Variationen der Subset-Komposition innerhalb der migrierenden T-Zellen nahe. Diese sollten gezielt in nachfolgenden Arbeiten untersucht werden.

Zusammenfassend weist die vorliegende Arbeit eine kontinuierliche Synthese S1Ps in DCs mit Stimulus-abhängiger Fluktuation nach. Eine MV-Infektion löst dabei einen zu inflammatorischen und bakteriellen Stimuli divergenten Effekt auf den S1P-Gehalt aus mit möglichen pathophysiologischen Konsequenzen. Eine Modulation der T-Zellchemotaxis und damit der DC-T-Zell-Interaktion wäre im Rahmen inflammatorischer, bakterieller oder viraler Szenarien denkbar. Unter inflammatorischen und bakteriellen Bedingungen trug S1P jedoch nicht zur T-Zellchemotaxis bei, für MV blieb dies unklar. Dahingegen zeigten weitere Experimente der Arbeitsgruppe einen autokrin vermittelten Beitrag des intrazellulär produzierten S1Ps zur Migration MV-infizierter DCs im respiratorischen Epithel und identifizierten damit einen bisher unbekanntem Einflussfaktor einer erfolgreichen MV-Transmission.

7. Abstract

As target for measles virus (MV) infection, dendritic cells (DCs) are central in MV pathogenesis also including viral dissemination and transmission. In this context, changes in sphingolipid metabolism and function of MV-infected DCs are described. Sphingosin-1-Phosphat (S1P) as a potent bioactive sphingolipid has pleiotropic functions in immunological processes. It regulates immune cell trafficking via autocrine or paracrine secretion and calcium homeostasis, apoptosis and proliferation via so far poorly defined intracellular signaling. Though compartment dependent S1P variations have been described, cell specific S1P metabolism remains mostly unclear. Little information is available in this regard for human DCs, especially under inflammatory, bacterial and viral (MV) conditions, while murine DCs were identified to continuously produce and secrete S1P.

In this study, the S1P pool in human DCs, its metabolism as well as its fluctuation in maturation and MV-infection were investigated. Considering its function as a chemoattractant, resulting consequences in T cell chemotaxis induced by DCs were addressed.

Sphingosinkinases (SphK1, SphK2), which generate, and S1P-Lyase (SPL), which irreversibly degrades S1P, were found to be expressed at the mRNA level in human immature DCs. Intracellular S1P was readily detected in immature DCs (iDCs), though they are unlikely to serve as S1P stores as described for erythrocytes. S1P concentrations decreased upon maturation triggered by cytokines (TNF- α) or bacterial components (LPS). In contrast, S1P levels corresponding to those measured in iDCs were retained in MV-infected DC culture. In addition to the modulation of chemokine synthesis and surface expression of co-stimulatory molecules, retention of S1P levels may also reflect incomplete DC maturation induced by this virus. As fluctuations of the sphingolipid pool between maturing (mDCs) and infected DCs only affected levels of S1P but not its precursors, differential regulation of sphingosine kinases or degrading enzymes are most likely important in elevated S1P levels. As accumulation of mRNAs specific for

SphK1, SphK2 and SPL was unaffected in MV-infected DC-cultures, regulation of the enzymes at translational, stability and/or activity level are likely to be operative.

Due to its S1P dependent internalization, S1P₁ serves as a surrogate marker of extracellular S1P level. The decreased intracellular S1P concentrations in mDCs were paralleled by upregulated S1P₁ expression making decreased S1P secretion likely. In MV infected DC culture secretion seems to be maintained at a level comparable to iDCs. Presuming continuous secretion of S1P, the detected S1P in DCs might contribute to S1P gradients among and within tissues, thus regulating lymphocyte migration. Findings obtained within this work do not support a role of S1P in T cell chemotaxis induced by mDCs. Experimental limitations precluded a final statement on a potential role of S1P in T cell chemotaxis induced by iDCs or MV-infected DCs. T cell chemotaxis induced by mDCs was highly directional in a two-dimensional system. At an overall quantitative basis, T cell chemotaxis induced by iDCs, mDCs or MV-infected DCs did not differ. As DCs are known to vary their chemokine expression depending on their differentiation status, it is, however, quite possible that the subset composition of the migrating T cell compartment differs; which has not been directly addressed in this work.

Altogether, this work revealed continuous production of S1P by human DCs with differentiation-dependent fluctuations. While intracellular S1P pools decreased with maturation induced by inflammatory conditions or LPS, these were fully retained upon MV infection. At a functional level, effects on T cell chemotaxis followed by differential interaction with DCs might be of pathogenetic advantage in inflammatory, bacterial or viral settings. However, S1P did not take part in T cell attraction by mDCs. Its contribution to T cell chemotaxis induced by MV infected DCs remains unsettled. However, further experiments in this research group revealed its importance in promoting migration in MV infected DCs by autocrine signaling, thus enabling efficient virus transmission.

8. Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
Abb	Abbildung
ABCC	ATP-binding cassette subfamily C
Akt	Serin/Threonin Proteinkinase
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ASM	Saure Sphingomyelinase (acid sphingomyelinase)
ATP	Adenosintriphosphat
ATV	Adjusted trypsin versene
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
cDNA	Copy DNA
Cer	Ceramid
CCR	Chemokinrezeptor
CCL	CC-Chemokinligand
CD	Cluster of differentiation
CXCL	CXC-Motiv-Chemokinligand
CPE	Zytopathischer Effekt (cytopathic effect)

CSFE	5,6-Carboxyfluorescein-Diacetat Succinimidyl Ester
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)
DC-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Edg1	S1P ₁
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
eGFP	Enhanced grün fluoreszierendes Protein
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin
FACS	Durchflusszytometrische Analyse (fluorescence-activated cell sorting)
FBS	Fetales bovines Serum
FIP	fusionsinhibitorisches Peptid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt 3 Ligand	Fms-related tyrosine kinase 3 ligand
F-Protein	Fusionsprotein
g	Gramm
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

h	Stunde
HGF	Hepatocyte growth factor
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	Humane Leukozytenantigene
H-Protein	Hämagglutinin-Protein
iDC	Unreife DC (immature DC)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGS	Intergenische Sequenz
IL	Interleukin
KLF2	Krüppel-like Faktor 2
l	Liter
LC	Langerhans-Zelle
LPP	Lipidphosphat-Phosphohydrolasen
L-Protein	Large-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
m	Meter
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
mDC	Ausgereifte DC (mature DC)

MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major histocompatibility complex
MIBE	Subakute Einschlusskörperchen-Enzephalitis (measles inclusion-body encephalitis)
min	Minute
MOI	Multiplicity of infection
M-Protein	Matrix-Protein
mRNA	Messenger RNA
MV	Masernvirus
NCR	Nicht-kodierender Abschnitt (non-coding region)
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	NOD-like Receptor
N-Protein	Nukleokapsid-Protein
n.s.	Nicht signifikant ($P > 0,05$)
NSM	Neutrale Sphingomyelinase
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphate buffered saline

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium-Iodid
PIE	Postinfektiöse Encephalitis
PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
P-Protein	Phosphoprotein
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PRR	Pattern Recognition Receptor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1P _{1/2/3/4/5}	S1P-Rezeptor 1/2/3/4/5
SDF-1 α	Stromal cell-derived factor 1 α
siRNA	Small-interfering RNA
SM	Sphingomyelin
SphK	Sphingosinkinase
SPL	S1P-Lyase
SPP	S1P-Phosphatasen

SSC	Sideward scatter
SSPE	Subakute sklerosierende Panencephalitis
STIKO	Ständige Impfkommission
TCR	T-Zell-Rezeptor (T-cell receptor)
Th	T-Helfer
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRAF2	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 2
TZ	T-Zelle
U	Unit
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation (world health organization)
WTF	Wildtyp Fleckenstein

9. Abbildungs-, Formel- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines MV Partikels. Mit Genehmigung aus (Sato et al. 2012) unter der Lizenz CC BY-NC 3.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/legalcode.de).....	3
Abbildung 2: Darstellung des MV Genoms	5
Abbildung 3: Sphingolipidmetabolismus	14
Abbildung 4: Signaltransduktion der S1P-Rezeptoren. Mit Genehmigung aus (Sanchez und Hla 2004) unter Lizenzvereinbarung vom 07.02.2020 mit John Wiley and Sons (Nummer 4763620769278)	16
Abbildung 5: Regulation der S1P ₁ -Expression (S1PR1) im Rahmen der T-Zell-Zirkulation.....	17
Abbildung 6: Generierung humaner dendritischer Zellen.....	34
Abbildung 7: Durchflusszytometrische Charakterisierung ausgereifter dendritischer Zellen.....	35
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Charakterisierung der T-Zellanreicherung	36
Abbildung 9: Beispiel einer Aufnahme nach Gelelektrophorese	42
Abbildung 10: Gating von DCs und T-Zellen mittels FSC und SSC.....	45
Abbildung 11: Festlegung der Regionen bei quantitativer Durchflusszytometrie	48
Abbildung 12: Probenpräparation zur Sphingolipidanalyse.....	49
Abbildung 13: Methodisches Vorgehen beim Transwell Assays primärer humaner T-Zellen in Antwort auf DCs.	52
Abbildung 14: S1P- und Sphingosin-Analyse in iDCs und Erythrozyten	55
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse von DCs nach Ausreifung	56
Abbildung 16: S1P-Analyse in DCs nach Ausreifung	57
Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse von DCs.....	58
Abbildung 18: S1P - Analyse in DCs nach Ausreifung und MV-Infektion.....	59
Abbildung 19: S1P ₁ -Oberflächenexpression in DCs nach Ausreifung und MV-Infektion.	60

Abbildung 20: ASM- und NSM-Aktivität nach Ausreifung und MV Infektion von DCs.	61
Abbildung 21: Lipidanalyse in iDCs.....	62
Abbildung 22: Lipidanalyse in DCs nach Ausreifung und MV-Infektion.....	63
Abb. 23: Zusammensetzung des Sphingomyelins in DCs.....	64
Abb. 24: Zusammensetzung des Ceramids in DCs.....	65
Abb. 25: RNA-Expression von SphK1, SphK2 und SPL in DCs.....	66
Abbildung 26: Jurkat-T-Zell-Chemotaxis in Antwort auf mDCs.....	68
Abbildung 27: Chemotaxis primärer T-Zellen nach 3 h Serumentzug.....	69
Abbildung 28: Chemotaxis primärer T-Zellen aus serumfreier X-Vivo-Kultur.....	70
Abbildung 29: Chemotaxis primärer T-Zellen in Antwort auf mDCs.....	71
Abbildung 30: Vergleich des chemoattraktiven Potenzials zwischen mDCs und SDF-1 α	72
Abbildung 31: Qualitative Analyse der T-Zellchemotaxis in Antwort auf mDCs und SDF-1 α	73
Abbildung 32: Vergleich des chemoattraktiven Potenzials zwischen iDCs und mDCs.	74
Abbildung 33: Vergleich des chemoattraktiven Potenzials nach Ausreifung und MV- Infektion.....	75
Abbildung 34: S1P ₁ -Oberflächenexpression in T-Zellen nach Einsetzen in X-Vivo	76
Abbildung 35: Prüfung von VPC 23019 auf T-Zellzytotoxizität.....	77
Abbildung 36: T-Zellchemotaxis in Antwort auf mDCs nach Hemmung von S1P ₁ und S1P ₃	78
Abbildung 37: Prüfung von SKI-II auf Zytotoxizität.....	79
Abbildung 38: Effekt einer SKI-II Behandlung auf das chemoattraktive Potenzial von mDCs.....	80
Abbildung 39: Auswirkungen von SKI-II auf die SDF-1 α -vermittelte T-Zellchemotaxis.	81
Abbildung 40: Durchflusszytometrische Analyse von transfizierten DCs.....	82
Abbildung 41: T-Zellchemotaxis nach Transfektion von DCs mit SphK1-siRNA	83
Abbildung 42: Prüfung von K145 auf Zytotoxizität.....	84
Abbildung 43: Effekt von K145 auf das chemoattraktive Potenzial von mDCs.....	85
Abbildung 44: Effekt von K145 auf die SDF-1 α -vermittelte T-Zellchemotaxis	86

Abbildung 45: Durchflusszytometrische Analyse der CD86-Oberflächenexpression in transfizierten DCs	87
--	----

9.2 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Anzahl vitaler Zellen.	31
Formel 2: Bestimmung der 50 % Endpunkttitration	38
Formel 3: Bestimmung des Standardfehlers der TCID50	38
Formel 4: Berechnung der absoluten Anzahl an migrierten T-Zellen in einer Probe. ...	48

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Primer.	24
Tabelle 2: Sequenzen der generierten siRNAs.	24
Tabelle 3: Verwendete Lösungen zur Isolation, Kultivierung und Quantifizierung von Zellen.	27
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen zur durchflusszytometrischen Analyse... 27	
Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen zur RNA-Analytik.	28
Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen zur Messung der Sphingomyelinasen-Aktivität.	28
Tabelle 7: Auflistung der Reagenzien mit Lösungsmittel.	29

10. Literaturverzeichnis

Abdul K. Abbas (2015): Cellular and Molecular Immunology. Unter Mitarbeit von Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Philadelphia: Elsevier Saunders.

Abdullah, Hani'ah; Brankin, Brenda; Brady, Clare; Cosby, Sara Louise (2013): Wild-type measles virus infection upregulates poliovirus receptor-related 4 and causes apoptosis in brain endothelial cells by induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 72 (7), S. 681–696. DOI: 10.1097/NEN.0b013e31829a26b6.

Abt, Marion (2006): Interaktion von Masernviren mit dendritischen Zellen. Untersuchungen zur Rezeptorbenutzung, Regulation der Chemotaxis und T-Zellkommunikation. Würzburg, Univ., Diss., 2006 (Nicht für den Austausch).

Abt, Marion; Gassert, Evelyn; Schneider-Schaulies, Sibylle (2009): Measles virus modulates chemokine release and chemotactic responses of dendritic cells. In: *The Journal of general virology* 90 (Pt 4), S. 909–914. DOI: 10.1099/vir.0.008581-0.

Adada, Mohamad M.; Canals, Daniel; Jeong, Nara; Kelkar, Ashwin D.; Hernandez-Corbacho, Maria; Pulkoski-Gross, Michael J. et al. (2015): Intracellular sphingosine kinase 2-derived sphingosine-1-phosphate mediates epidermal growth factor-induced ezrin-radixin-moesin phosphorylation and cancer cell invasion. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29 (11), S. 4654–4669. DOI: 10.1096/fj.15-274340.

Adema, G. J.; Hartgers, F.; Verstraten, R.; Vries, E. de; Marland, G.; Menon, S. et al. (1997): A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. In: *Nature* 387 (6634), S. 713–717. DOI: 10.1038/42716.

Aiba, S.; Tagami, H. (1998): Dendritic cell activation induced by various stimuli, e.g. exposure to microorganisms, their products, cytokines, and simple chemicals as well as adhesion to extracellular matrix. In: *Journal of dermatological science* 20 (1), S. 1–13.

Allende, Maria L.; Tuymetova, Galina; Lee, Bridgin G.; Bonifacino, Eliana; Wu, Yun-Ping; Proia, Richard L. (2010): S1P1 receptor directs the release of immature B cells

from bone marrow into blood. In: *The Journal of experimental medicine* 207 (5), S. 1113–1124. DOI: 10.1084/jem.20092210.

Alvarez, Sergio E.; Harikumar, Kuzhuvelil B.; Hait, Nitai C.; Allegood, Jeremy; Strub, Graham M.; Kim, Eugene Y. et al. (2010): Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. In: *Nature* 465 (7301), S. 1084–1088. DOI: 10.1038/nature09128.

Ancellin, Nicolas; Colmont, Chantal; Su, Joseph; Li, Qin; Mittereder, Nanette; Chae, Sung-Suk et al. (2002): Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (8), S. 6667–6675. DOI: 10.1074/jbc.M102841200.

Anliker, Brigitte; Chun, Jerold (2004): Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. In: *Seminars in cell & developmental biology* 15 (5), S. 457–465. DOI: 10.1016/j.semcdb.2004.05.005.

Arish, Mohd; Husein, Atahar; Kashif, Mohammad; Saleem, Mohammed; Akhter, Yusuf; Rub, Abdur (2016): Sphingosine-1-phosphate signaling: unraveling its role as a drug target against infectious diseases. In: *Drug discovery today* 21 (1), S. 133–142. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.09.013.

Arlt, Olga; Schwiebs, Anja; Japtok, Lukasz; Ruger, Katja; Katzy, Elisabeth; Kleuser, Burkhard; Radeke, Heinfried H. (2014): Sphingosine-1-phosphate modulates dendritic cell function: focus on non-migratory effects in vitro and in vivo. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 34 (1), S. 27–44. DOI: 10.1159/000362982.

Atabani, S. F.; Byrnes, A. A.; Jaye, A.; Kidd, I. M.; Magnusen, A. F.; Whittle, H.; Karp, C. L. (2001): Natural measles causes prolonged suppression of interleukin-12 production. In: *The Journal of infectious diseases* 184 (1), S. 1–9. DOI: 10.1086/321009.

Avota, E.; Avots, A.; Niewiesk, S.; Kane, L. P.; Bommhardt, U.; ter Meulen, V.; Schneider-Schaulies, S. (2001): Disruption of Akt kinase activation is important for

- immunosuppression induced by measles virus. In: *Nature medicine* 7 (6), S. 725–731. DOI: 10.1038/89106.
- Avota, Elita; Gulbins, Erich; Schneider-Schaulies, Sibylle (2011): DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells. In: *PLoS pathogens* 7 (2), e1001290. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001290.
- Bachelier, Françoise; Graham, Gerard J.; Locati, Massimo; Mantovani, Alberto; Murphy, Philip M.; Nibbs, Robert et al. (2014): New nomenclature for atypical chemokine receptors. In: *Nature immunology* 15 (3), S. 207–208. DOI: 10.1038/ni.2812.
- Baekkevold, E. S.; Yamanaka, T.; Palframan, R. T.; Carlsen, H. S.; Reinholt, F. P.; Andrian, U. H. von et al. (2001): The CCR7 ligand e1c (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. In: *The Journal of experimental medicine* 193 (9), S. 1105–1112.
- Bagdanoff, Jeffrey T.; Donoviel, Michael S.; Nouraldeen, Amr; Carlsen, Marianne; Jessop, Theodore C.; Tarver, James et al. (2010): Inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase for the treatment of rheumatoid arthritis: discovery of (E)-1-(4-((1R,2S,3R)-1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)-1H-imidazol-2-yl)ethanone oxime (LX2931) and (1R,2S,3R)-1-(2-(isoxazol-3-yl)-1H-imidazol-4-yl)butane-1,2,3,4-tetraol (LX2932). In: *Journal of medicinal chemistry* 53 (24), S. 8650–8662. DOI: 10.1021/jm101183p.
- Banchereau, J.; Steinman, R. M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature* 392 (6673), S. 245–252. DOI: 10.1038/32588.
- Banerjee, A. K. (1987): The transcription complex of vesicular stomatitis virus. In: *Cell* 48 (3), S. 363–364.
- Bankovich, Alexander J.; Shiow, Lawrence R.; Cyster, Jason G. (2010): CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (29), S. 22328–22337. DOI: 10.1074/jbc.M110.123299.
- Bellini, W. J.; Englund, G.; Rozenblatt, S.; Arnheiter, H.; Richardson, C. D. (1985): Measles virus P gene codes for two proteins. In: *Journal of virology* 53 (3), S. 908–919.

- Bellini, W. J.; Rota, J. S.; Rota, P. A. (1994): Virology of measles virus. In: *The Journal of infectious diseases* 170 Suppl 1, S15-23.
- Benko, Szilvia; Magyarics, Zoltan; Szabo, Attila; Rajnavolgyi, Eva (2008): Dendritic cell subtypes as primary targets of vaccines: the emerging role and cross-talk of pattern recognition receptors. In: *Biological chemistry* 389 (5), S. 469–485.
- Bieback, Karen; Lien, Egil; Klagge, Ingo M.; Avota, Elita; Schneider-Schaulies, Jurgen; Duprex, W. Paul et al. (2002): Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. In: *Journal of virology* 76 (17), S. 8729–8736.
- Bleul, C. C.; Fuhlbrigge, R. C.; Casasnovas, J. M.; Aiuti, A.; Springer, T. A. (1996): A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). In: *The Journal of experimental medicine* 184 (3), S. 1101–1109.
- Bloch, A. B.; Orenstein, W. A.; Ewing, W. M.; Spain, W. H.; Mallison, G. F.; Herrmann, K. L.; Hinman, A. R. (1985): Measles outbreak in a pediatric practice: airborne transmission in an office setting. In: *Pediatrics* 75 (4), S. 676–683.
- Bourgoin, Sylvain G.; Zhao, Chenqi (2010): Autotaxin and lysophospholipids in rheumatoid arthritis. In: *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* 11 (5), S. 515–526.
- Buchanan, Renee; Bonthius, Daniel J. (2012): Measles virus and associated central nervous system sequelae. In: *Seminars in pediatric neurology* 19 (3), S. 107–114. DOI: 10.1016/j.spn.2012.02.003.
- Burnet, F. M. (1968): Measles as an index of immunological function. In: *Lancet (London, England)* 2 (7568), S. 610–613. DOI: 10.1016/s0140-6736(68)90701-0.
- Cartier, Andreane; Hla, Timothy (2019): Sphingosine 1-phosphate. Lipid signaling in pathology and therapy. In: *Science (New York, N.Y.)* 366 (6463). DOI: 10.1126/science.aar5551.
- Castellino, Flora; Huang, Alex Y.; Altan-Bonnet, Gregoire; Stoll, Sabine; Scheinecker, Clemens; Germain, Ronald N. (2006): Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. In: *Nature* 440 (7086), S. 890–895. DOI: 10.1038/nature04651.

Cathomen, T.; Mrkic, B.; Spehner, D.; Drillien, R.; Naef, R.; Pavlovic, J. et al. (1998): A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. In: *The EMBO journal* 17 (14), S. 3899–3908. DOI: 10.1093/emboj/17.14.3899.

Cattaneo, R.; Rebmann, G.; Schmid, A.; Baczko, K.; ter Meulen, V.; Billeter, M. A. (1987): Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. In: *The EMBO journal* 6 (3), S. 681–688.

Caux, C.; Dezutter-Dambuyant, C.; Schmitt, D.; Banchereau, J. (1992): GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. In: *Nature* 360 (6401), S. 258–261. DOI: 10.1038/360258a0.

Caux, C.; Massacrier, C.; Vanbervliet, B.; Dubois, B.; van Kooten, C.; Durand, I.; Banchereau, J. (1994): Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. In: *The Journal of experimental medicine* 180 (4), S. 1263–1272.

Caux, Christophe; Vanbervliet, Beatrice; Massacrier, Catherine; Ait-Yahia, Smina; Vaure, Celine; Chemin, Karine et al. (2002): Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. In: *Transplantation* 73 (1 Suppl), S7-11.

Cella, M.; Engering, A.; Pinet, V.; Pieters, J.; Lanzavecchia, A. (1997): Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. In: *Nature* 388 (6644), S. 782–787. DOI: 10.1038/42030.

Cella, M.; Jarrossay, D.; Facchetti, F.; Alebardi, O.; Nakajima, H.; Lanzavecchia, A.; Colonna, M. (1999): Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. In: *Nature medicine* 5 (8), S. 919–923. DOI: 10.1038/11360.

Cella, M.; Scheidegger, D.; Palmer-Lehmann, K.; Lane, P.; Lanzavecchia, A.; Alber, G. (1996): Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. In: *The Journal of experimental medicine* 184 (2), S. 747–752.

Checa, Antonio; Xu, Ning; Sar, Daniel G.; Haeggstrom, Jesper Z.; Stahle, Mona; Wheelock, Craig E. (2015): Circulating levels of sphingosine-1-phosphate are elevated

in severe, but not mild psoriasis and are unresponsive to anti-TNF-alpha treatment. In: *Scientific reports* 5, S. 12017. DOI: 10.1038/srep12017.

Cinamon, Guy; Zachariah, Marcus A.; Lam, Olivia M.; Foss, Frank W., JR; Cyster, Jason G. (2008): Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. In: *Nature immunology* 9 (1), S. 54–62. DOI: 10.1038/ni1542.

Collin, Matthew; McGovern, Naomi; Haniffa, Muzlifah (2013): Human dendritic cell subsets. In: *Immunology* 140 (1), S. 22–30. DOI: 10.1111/imm.12117.

Crowley, J. C.; Dowling, P. C.; Menonna, J.; Silverman, J. I.; Schuback, D.; Cook, S. D.; Blumberg, B. M. (1988): Sequence variability and function of measles virus 3' and 5' ends and intergenic regions. In: *Virology* 164 (2), S. 498–506.

Cuvillier, O.; Pirianov, G.; Kleuser, B.; Vanek, P. G.; Coso, O. A.; Gutkind, S.; Spiegel, S. (1996): Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. In: *Nature* 381 (6585), S. 800–803. DOI: 10.1038/381800a0.

Dahm, F.; Nocito, A.; Bielawska, A.; Lang, K. S.; Georgiev, P.; Asmis, L. M. et al. (2006): Distribution and dynamic changes of sphingolipids in blood in response to platelet activation. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 4 (12), S. 2704–2709. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.02241.x.

Daniel, Carolin; Sartory, Nico; Zahn, Nadine; Geisslinger, Gerd; Radeke, Heinfried H.; Stein, Juergen M. (2007): FTY720 ameliorates Th1-mediated colitis in mice by directly affecting the functional activity of CD4+CD25+ regulatory T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (4), S. 2458–2468.

Derakhshani, Shaghayegh; Kurz, Andreas; Japtok, Lukasz; Schumacher, Fabian; Pilgram, Lisa; Steinke, Maria et al. (2019): Measles Virus Infection Fosters Dendritic Cell Motility in a 3D Environment to Enhance Transmission to Target Cells in the Respiratory Epithelium. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 1294. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01294.

Devaux, Patricia; Cattaneo, Roberto (2004): Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. In: *Journal of virology* 78 (21), S. 11632–11640. DOI: 10.1128/JVI.78.21.11632-11640.2004.

Die Bundesregierung der Bundesrepublik Deutschland (2019): Entwurf eines Gesetzes für den Schutz vor Masern und zur Stärkung der Impfprävention (Masernschutzgesetz). Deutscher Bundestag, 19. Wahlperiode. Berlin (Deutscher Bundestag, Drucksache 19/13452). Online verfügbar unter <https://dip21.bundestag.de/dip21/btd/19/134/1913452.pdf>, zuletzt geprüft am 03.01.2020.

Dixit, Dhaval; Okuniewska, Martyna; Schwab, Susan R. (2019): Secrets and lyase. Control of sphingosine 1-phosphate distribution. In: *Immunological reviews* 289 (1), S. 173–185. DOI: 10.1111/imr.12760.

Dorig, R. E.; Marcil, A.; Chopra, A.; Richardson, C. D. (1993): The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). In: *Cell* 75 (2), S. 295–305.

Dreschers, Stephan; Franz, Peter; Dumitru, Claudia; Wilker, Barbara; Jahnke, Klaus; Gulbins, Erich (2007): Infections with human rhinovirus induce the formation of distinct functional membrane domains. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 20 (1-4), S. 241–254. DOI: 10.1159/000104170.

Duan, Hai-Feng; Wu, Chu-Tse; Lu, Ying; Wang, Hua; Liu, Hong-Jun; Zhang, Qun-Wei et al. (2004): Sphingosine kinase activation regulates hepatocyte growth factor induced migration of endothelial cells. In: *Experimental cell research* 298 (2), S. 593–601. DOI: 10.1016/j.yexcr.2004.04.049.

Eigenbrod, S.; Derwand, R.; Jakl, V.; Endres, S.; Eigler, A. (2006): Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate regulate migration, endocytosis and apoptosis of dendritic cells. In: *Immunological investigations* 35 (2), S. 149–165. DOI: 10.1080/08820130600616490.

Escoffier, C.; Manie, S.; Vincent, S.; Muller, C. P.; Billeter, M.; Gerlier, D. (1999): Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. In: *Journal of virology* 73 (2), S. 1695–1698.

Falcone, Sestina; Perrotta, Cristiana; Palma, Clara de; Pisconti, Addolorata; Sciorati, Clara; Capobianco, Annalisa et al. (2004): Activation of acid sphingomyelinase and its inhibition by the nitric oxide/cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway: key events

in *Escherichia coli*-elicited apoptosis of dendritic cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173 (7), S. 4452–4463.

Fanger, N. A.; Wardwell, K.; Shen, L.; Tedder, T. F.; Guyre, P. M. (1996): Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 157 (2), S. 541–548.

Fischer, Iris; Alliod, Chantal; Martinier, Nicolas; Newcombe, Jia; Brana, Corinne; Pouly, Sandrine (2011): Sphingosine kinase 1 and sphingosine 1-phosphate receptor 3 are functionally upregulated on astrocytes under pro-inflammatory conditions. In: *PloS one* 6 (8), e23905. DOI: 10.1371/journal.pone.0023905.

Forster, R.; Schubel, A.; Breitfeld, D.; Kremmer, E.; Renner-Muller, I.; Wolf, E.; Lipp, M. (1999): CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. In: *Cell* 99 (1), S. 23–33.

Frenzke, Marie; Sawatsky, Bevan; Wong, Xiao X.; Delpeut, Sebastien; Mateo, Mathieu; Cattaneo, Roberto; Messling, Veronika von (2013): Nectin-4-dependent measles virus spread to the cynomolgus monkey tracheal epithelium: role of infected immune cells infiltrating the lamina propria. In: *Journal of virology* 87 (5), S. 2526–2534. DOI: 10.1128/JVI.03037-12.

Fugier-Vivier, I.; Servet-Delprat, C.; Rivaille, P.; Rissoan, M. C.; Liu, Y. J.; Roubourdin-Combe, C. (1997): Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. In: *The Journal of experimental medicine* 186 (6), S. 813–823.

Fukuhara, Shigetomo; Simmons, Szandor; Kawamura, Shunsuke; Inoue, Asuka; Orba, Yasuko; Tokudome, Takeshi et al. (2012): The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (4), S. 1416–1426. DOI: 10.1172/JCI60746.

Gaengel, Konstantin; Niaudet, Colin; Hagikura, Kazuhiro; Lavina, Barbara; Muhl, Lars; Hofmann, Jennifer J. et al. (2012): The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2. In: *Developmental cell* 23 (3), S. 587–599. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.08.005.

Gassert, Evelyn (2011): Die Bedeutung von Ceramiden für die Reorganisation des Zytoskeletts in T-Zellen, die Ausbildung einer immunologischen Synapse und die T-Zell-Aktivierung. = Impact of ceramide accumulation on T lymphocyte cytoskeletal reorganisation, immune synapse formation and activation. Würzburg, Universität Würzburg, Diss., 2011. Würzburg: Universitätsbibliothek der Universität Würzburg. Online verfügbar unter <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/volltexte/2011/6512>.

Gassert, Evelyn; Avota, Elita; Harms, Harry; Krohne, Georg; Gulbins, Erich; Schneider-Schaulies, Sibylle (2009): Induction of membrane ceramides: a novel strategy to interfere with T lymphocyte cytoskeletal reorganisation in viral immunosuppression. In: *PLoS pathogens* 5 (10), e1000623. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000623.

Geissmann, Frederic; Manz, Markus G.; Jung, Steffen; Sieweke, Michael H.; Merad, Miriam; Ley, Klaus (2010): Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 327 (5966), S. 656–661. DOI: 10.1126/science.1178331.

Ghosh, T. K.; Bian, J.; Gill, D. L. (1990): Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivatives generated in cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 248 (4963), S. 1653–1656.

Gonzalo, Jose-Angel; Qiu, Yubin; Lora, Jose M.; Al-Garawi, Amal; Villeval, Jean-Luc; Boyce, Joshua A. et al. (2007): Coordinated involvement of mast cells and T cells in allergic mucosal inflammation: critical role of the CC chemokine ligand 1:CCR8 axis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (3), S. 1740–1750.

Gordon, Siamon (2002): Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. In: *Cell* 111 (7), S. 927–930.

Grassme, H.; Gulbins, E.; Brenner, B.; Ferlinz, K.; Sandhoff, K.; Harzer, K. et al. (1997): Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells. In: *Cell* 91 (5), S. 605–615.

Green, Jesse A.; Suzuki, Kazuhiro; Cho, Bryan; Willison, L. David; Palmer, Daniel; Allen, Christopher D. C. et al. (2011): The sphingosine 1-phosphate receptor S1P(2)

maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. In: *Nature immunology* 12 (7), S. 672–680. DOI: 10.1038/ni.2047.

Griffin, D. E. (1995): Immune responses during measles virus infection. In: *Current topics in microbiology and immunology* 191, S. 117–134.

Griffin, D. E.; Ward, B. J. (1993): Differential CD4 T cell activation in measles. In: *The Journal of infectious diseases* 168 (2), S. 275–281.

Griffin, D. E.; Ward, B. J.; Jauregui, E.; Johnson, R. T.; Vaisberg, A. (1989): Immune activation in measles. In: *The New England journal of medicine* 320 (25), S. 1667–1672. DOI: 10.1056/NEJM198906223202506.

Griffin, D. E.; Ward, B. J.; Jauregui, E.; Johnson, R. T.; Vaisberg, A. (1990): Immune activation during measles: interferon-gamma and neopterin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease. In: *The Journal of infectious diseases* 161 (3), S. 449–453.

Griffin, Diane E. (2010): Measles virus-induced suppression of immune responses. In: *Immunological reviews* 236, S. 176–189. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00925.x.

Griffin, Diane E. (2016): The Immune Response in Measles. Virus Control, Clearance and Protective Immunity. In: *Viruses* 8 (10). DOI: 10.3390/v8100282.

Griffith, Jason W.; Sokol, Caroline L.; Luster, Andrew D. (2014): Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. In: *Annual review of immunology* 32, S. 659–702. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120145.

Hait, Nitai C.; Allegood, Jeremy; Maceyka, Michael; Strub, Graham M.; Harikumar, Kuzhuvelil B.; Singh, Sandeep K. et al. (2009): Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. In: *Science (New York, N.Y.)* 325 (5945), S. 1254–1257. DOI: 10.1126/science.1176709.

Hait, Nitai C.; Sarkar, Sukumar; Le Stunff, Herve; Mikami, Aki; Maceyka, Michael; Milstien, Sheldon; Spiegel, Sarah (2005): Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (33), S. 29462–29469. DOI: 10.1074/jbc.M502922200.

- Hanada, Kentaro (2005): Sphingolipids in infectious diseases. In: *Japanese journal of infectious diseases* 58 (3), S. 131–148.
- Hanel, Petra; Andreani, Paul; Graler, Markus H. (2007): Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (4), S. 1202–1209. DOI: 10.1096/fj.06-7433com.
- Hannun, Yusuf A.; Obeid, Lina M. (2008): Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (2), S. 139–150. DOI: 10.1038/nrm2329.
- Hartmann, Daniela; Lucks, Jessica; Fuchs, Sina; Schiffmann, Susanne; Schreiber, Yannick; Ferreiros, Nerea et al. (2012): Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 44 (4), S. 620–628. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.12.019.
- Hartmann, Daniela; Wegner, Marthe-Susanna; Wanger, Ruth Anna; Ferreiros, Nerea; Schreiber, Yannick; Lucks, Jessica et al. (2013): The equilibrium between long and very long chain ceramides is important for the fate of the cell and can be influenced by co-expression of CerS. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 45 (7), S. 1195–1203. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.03.012.
- Hartmann, G.; Weiner, G. J.; Krieg, A. M. (1999): CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (16), S. 9305–9310.
- Henke-Gendo, Cornelia (2012): Paramyxoviren. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin [u.a.]: Springer, S. 482–490. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-24167-3>.
- Hickman, Heather D.; Li, Lily; Reynoso, Glennys V.; Rubin, Erica J.; Skon, Cara N.; Mays, Jacqueline W. et al. (2011): Chemokines control naive CD8+ T cell selection of optimal lymph node antigen presenting cells. In: *The Journal of experimental medicine* 208 (12), S. 2511–2524. DOI: 10.1084/jem.20102545.

- Hla, T.; Maciag, T. (1990): An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (16), S. 9308–9313.
- Hla, Timothy; Venkataraman, Krishnan; Michaud, Jason (2008): The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance. In: *Biochimica et biophysica acta* 1781 (9), S. 477–482. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2008.07.003.
- Hobson, J. P.; Rosenfeldt, H. M.; Barak, L. S.; Olivera, A.; Poulton, S.; Caron, M. G. et al. (2001): Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. In: *Science (New York, N.Y.)* 291 (5509), S. 1800–1803. DOI: 10.1126/science.1057559.
- Horikami, S. M.; Smallwood, S.; Bankamp, B.; Moyer, S. A. (1994): An amino-proximal domain of the L protein binds to the P protein in the measles virus RNA polymerase complex. In: *Virology* 205 (2), S. 540–545. DOI: 10.1006/viro.1994.1676.
- Iino, Junko; Osada, Makoto; Kurano, Makoto; Kaneko, Makoto; Ohkawa, Ryunosuke; Satoh, Yumiko et al. (2014): Platelet-derived sphingosine 1-phosphate induces migration of Jurkat T cells. In: *Lipids in health and disease* 13, S. 150. DOI: 10.1186/1476-511X-13-150.
- Ito, Kiyoharu; Anada, Yoshihiro; Tani, Motohiro; Ikeda, Mika; Sano, Takamitsu; Kihara, Akio; Igarashi, Yasuyuki (2007): Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. In: *Biochemical and biophysical research communications* 357 (1), S. 212–217. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.03.123.
- Jaigirdar, Shafqat Ahrar; Benson, Robert A.; Elmesmari, Aziza; Kurowska-Stolarska, Mariola Stefania; McInnes, Iain B.; Garside, Paul; MacLeod, Megan K. L. (2017): Sphingosine-1-Phosphate Promotes the Persistence of Activated CD4 T Cells in Inflamed Sites. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 1627. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01627.
- Japtok, Lukasz; Schaper, Katrin; Baumer, Wolfgang; Radeke, Heinfried H.; Jeong, Se Kyoo; Kleuser, Burkhard (2012): Sphingosine 1-phosphate modulates antigen capture by murine Langerhans cells via the S1P2 receptor subtype. In: *PloS one* 7 (11), e49427. DOI: 10.1371/journal.pone.0049427.

- Jenne, Craig N.; Enders, Anselm; Rivera, Richard; Watson, Susan R.; Bankovich, Alexander J.; Pereira, Joao P. et al. (2009): T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. In: *The Journal of experimental medicine* 206 (11), S. 2469–2481. DOI: 10.1084/jem.20090525.
- Jolly, Puneet S.; Bektas, Meryem; Olivera, Ana; Gonzalez-Espinosa, Claudia; Proia, Richard L.; Rivera, Juan et al. (2004): Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. In: *The Journal of experimental medicine* 199 (7), S. 959–970. DOI: 10.1084/jem.20030680.
- Jong, J. G. de; Winkler, K. C. (1964): Survival of Measles Virus in Air. In: *Nature* 201, S. 1054–1055.
- Jonnalagadda, Deepa; Sunkara, Manjula; Morris, Andrew J.; Whiteheart, Sidney W. (2014): Granule-mediated release of sphingosine-1-phosphate by activated platelets. In: *Biochimica et biophysica acta* 1841 (11), S. 1581–1589. DOI: 10.1016/j.bbali.2014.08.013.
- Jonuleit, H.; Kuhn, U.; Muller, G.; Steinbrink, K.; Paragnik, L.; Schmitt, E. et al. (1997): Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. In: *European journal of immunology* 27 (12), S. 3135–3142. DOI: 10.1002/eji.1830271209.
- Jung, In Duk; Lee, Jun Sik; Kim, Yong Joo; Jeong, Young-II; Lee, Chang-Min; Baumruker, Thomas et al. (2007): Sphingosine kinase inhibitor suppresses a Th1 polarization via the inhibition of immunostimulatory activity in murine bone marrow-derived dendritic cells. In: *International immunology* 19 (4), S. 411–426. DOI: 10.1093/intimm/dxm006.
- Jung, Steffen; Unutmaz, Derya; Wong, Phillip; Sano, Gen-Ichiro; los Santos, Kenia de; Sparwasser, Tim et al. (2002): In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. In: *Immunity* 17 (2), S. 211–220. DOI: 10.1016/s1074-7613(02)00365-5.
- Khan, Imtiaz A.; Thomas, Seddon Y.; Moretto, Magali M.; Lee, Frederick S.; Islam, Sabina A.; Combe, Crescent et al. (2006): CCR5 is essential for NK cell trafficking and

host survival following *Toxoplasma gondii* infection. In: *PLoS pathogens* 2 (6), e49. DOI: 10.1371/journal.ppat.0020049.

Kharel, Yugesh; Lee, Sangderk; Snyder, Ashley H.; Sheasley-O'Neill, Stacey L.; Morris, Margaret A.; Setiady, Yulius et al. (2005): Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (44), S. 36865–36872. DOI: 10.1074/jbc.M506293200.

Klagge, I. M.; ter Meulen, V.; Schneider-Schaulies, S. (2000): Measles virus-induced promotion of dendritic cell maturation by soluble mediators does not overcome the immunosuppressive activity of viral glycoproteins on the cell surface. In: *European journal of immunology* 30 (10), S. 2741–2750. DOI: 10.1002/1521-4141(200010)30:10<2741::AID-IMMU2741>3.0.CO;2-N.

Koplik (1896): The diagnosis of the invasion of measles from a study of exanthema as it appears on the buccal mucous membrane. In: *Arch Pediatr* (12), S. 918–920.

Ksiazek, Monika; Chacinska, Marta; Chabowski, Adrian; Baranowski, Marcin (2015): Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. In: *Journal of lipid research* 56 (7), S. 1271–1281. DOI: 10.1194/jlr.R059543.

Kupperman, E.; An, S.; Osborne, N.; Waldron, S.; Stainier, D. Y. (2000): A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. In: *Nature* 406 (6792), S. 192–195. DOI: 10.1038/35018092.

Laksono, Brigitta M.; Grosserichter-Wagener, Christina; Vries, Rory D. de; Langeveld, Simone A. G.; Brem, Maarten D.; van Dongen, Jacques J. M. et al. (2018): In Vitro Measles Virus Infection of Human Lymphocyte Subsets Demonstrates High Susceptibility and Permissiveness of both Naive and Memory B Cells. In: *Journal of virology* 92 (8). DOI: 10.1128/JVI.00131-18.

Ledgerwood, Levi G.; Lal, Girdhari; Zhang, Nan; Garin, Alexandre; Esses, Steven J.; Ginhoux, Florent et al. (2008): The sphingosine 1-phosphate receptor 1 causes tissue retention by inhibiting the entry of peripheral tissue T lymphocytes into afferent lymphatics. In: *Nature immunology* 9 (1), S. 42–53. DOI: 10.1038/ni1534.

- Lee, M. J.; van Brocklyn, J. R.; Thangada, S.; Liu, C. H.; Hand, A. R.; Menzeleev, R. et al. (1998): Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. In: *Science (New York, N.Y.)* 279 (5356), S. 1552–1555.
- Lee, Yong-Moon; Venkataraman, Krishnan; Hwang, Sun-II; Han, David K.; Hla, Timothy (2007): A novel method to quantify sphingosine 1-phosphate by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). In: *Prostaglandins & other lipid mediators* 84 (3-4), S. 154–162. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2007.08.001.
- Lemon, Ken; Vries, Rory D. de; Mesman, Annelies W.; McQuaid, Stephen; van Amerongen, Geert; Yuksel, Selma et al. (2011): Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. In: *PLoS pathogens* 7 (1), e1001263. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001263.
- Lim, Jet Phey; Gleeson, Paul A. (2011): Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. In: *Immunology and cell biology* 89 (8), S. 836–843. DOI: 10.1038/icb.2011.20.
- Lin, Wen-Hsuan W.; Kouyos, Roger D.; Adams, Robert J.; Grenfell, Bryan T.; Griffin, Diane E. (2012): Prolonged persistence of measles virus RNA is characteristic of primary infection dynamics. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (37), S. 14989–14994. DOI: 10.1073/pnas.1211138109.
- Liu, C. H.; Thangada, S.; Lee, M. J.; van Brocklyn, J. R.; Spiegel, S.; Hla, T. (1999): Ligand-induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1. In: *Molecular biology of the cell* 10 (4), S. 1179–1190.
- Ludlow, Martin; Lemon, Ken; Vries, Rory D. de; McQuaid, Stephen; Millar, Emma L.; van Amerongen, Geert et al. (2013): Measles virus infection of epithelial cells in the macaque upper respiratory tract is mediated by subepithelial immune cells. In: *Journal of virology* 87 (7), S. 4033–4042. DOI: 10.1128/JVI.03258-12.
- Ludlow, Martin; McQuaid, Stephen; Milner, Dan; Swart, Rik L. de; Duprex, W. Paul (2015): Pathological consequences of systemic measles virus infection. In: *The Journal of pathology* 235 (2), S. 253–265. DOI: 10.1002/path.4457.

- Lutz, Manfred B.; Schuler, Gerold (2002): Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? In: *Trends in immunology* 23 (9), S. 445–449.
- Maceyka, Michael; Sankala, Heidi; Hait, Nitai C.; Le Stunff, Herve; Liu, Hong; Toman, Rachelle et al. (2005): SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (44), S. 37118–37129. DOI: 10.1074/jbc.M502207200.
- Maceyka, Michael; Spiegel, Sarah (2014): Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. In: *Nature* 510 (7503), S. 58–67. DOI: 10.1038/nature13475.
- Mackay, Laura K.; Braun, Asolina; Macleod, Bethany L.; Collins, Nicholas; Tebartz, Christina; Bedoui, Sammy et al. (2015): Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (5), S. 2059–2063. DOI: 10.4049/jimmunol.1402256.
- Malik, Zulfiqar A.; Thompson, Christopher R.; Hashimi, Samad; Porter, Brandon; Iyer, Shankar S.; Kusner, David J. (2003): Cutting edge: Mycobacterium tuberculosis blocks Ca²⁺ signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (6), S. 2811–2815.
- Manicassamy, Santhakumar; Pulendran, Bali (2011): Dendritic cell control of tolerogenic responses. In: *Immunological reviews* 241 (1), S. 206–227. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01015.x.
- Marshall, Jean S. (2004): Mast-cell responses to pathogens. In: *Nature reviews. Immunology* 4 (10), S. 787–799. DOI: 10.1038/nri1460.
- Marzio, R.; Jirillo, E.; Ransijn, A.; Mauel, J.; Corradin, S. B. (1997): Expression and function of the early activation antigen CD69 in murine macrophages. In: *Journal of leukocyte biology* 62 (3), S. 349–355.
- Matloubian, Mehrdad; Lo, Charles G.; Cinamon, Guy; Lesneski, Matthew J.; Xu, Ying; Brinkmann, Volker et al. (2004): Lymphocyte egress from thymus and peripheral

lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. In: *Nature* 427 (6972), S. 355–360. DOI: 10.1038/nature02284.

McChesney, M. B.; Miller, C. J.; Rota, P. A.; Zhu, Y. D.; Antipa, L.; Lerche, N. W. et al. (1997): Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. In: *Virology* 233 (1), S. 74–84. DOI: 10.1006/viro.1997.8576.

Mendoza, Alejandra; Bréart, Béatrice; Ramos-Perez, Willy D.; Pitt, Lauren A.; Gobert, Michael; Sunkara, Manjula et al. (2012): The transporter Spns2 is required for secretion of lymph but not plasma sphingosine-1-phosphate. In: *Cell reports* 2 (5), S. 1104–1110. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.09.021.

Merad, Miriam; Sathe, Priyanka; Helft, Julie; Miller, Jennifer; Mortha, Arthur (2013): The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. In: *Annual review of immunology* 31, S. 563–604. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074950.

Mesman, Annelies W.; Vries, Rory D. de; McQuaid, Stephen; Duprex, W. Paul; Swart, Rik L. de; Geijtenbeek, Teunis B. H. (2012): A prominent role for DC-SIGN+ dendritic cells in initiation and dissemination of measles virus infection in non-human primates. In: *PloS one* 7 (12), e49573. DOI: 10.1371/journal.pone.0049573.

Messias, Carolina V.; Santana-Van-Vliet, Eliane; Lemos, Julia P.; Moreira, Otacilio C.; Cotta-de-Almeida, Vinicius; Savino, Wilson; Mendes-da-Cruz, Daniella Areas (2016): Sphingosine-1-Phosphate Induces Dose-Dependent Chemotaxis or Fugetaxis of T-ALL Blasts through S1P1 Activation. In: *PloS one* 11 (1), e0148137. DOI: 10.1371/journal.pone.0148137.

Michaud, Jason; Im, Dong-Soon; Hla, Timothy (2010): Inhibitory role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in macrophage recruitment during inflammation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (3), S. 1475–1483. DOI: 10.4049/jimmunol.0901586.

Mina, Michael J.; Metcalf, C. Jessica E.; Swart, Rik L. de; Osterhaus, A D M E; Grenfell, Bryan T. (2015): Long-term measles-induced immunomodulation increases overall childhood infectious disease mortality. In: *Science (New York, N.Y.)* 348 (6235), S. 694–699. DOI: 10.1126/science.aaa3662.

- Mizugishi, Kiyomi; Yamashita, Tadashi; Olivera, Ana; Miller, Georgina F.; Spiegel, Sarah; Proia, Richard L. (2005): Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. In: *Molecular and cellular biology* 25 (24), S. 11113–11121. DOI: 10.1128/MCB.25.24.11113-11121.2005.
- Moss, William J.; Ryon, Judith J.; Monze, Mwaka; Griffin, Diane E. (2002): Differential regulation of interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 during measles in Zambian children. In: *The Journal of infectious diseases* 186 (7), S. 879–887. DOI: 10.1086/344230.
- Mudd, Joseph C.; Murphy, Patrick; Manion, Maura; Debernardo, Robert; Hardacre, Jeffrey; Ammori, John et al. (2013): Impaired T-cell responses to sphingosine-1-phosphate in HIV-1 infected lymph nodes. In: *Blood* 121 (15), S. 2914–2922. DOI: 10.1182/blood-2012-07-445783.
- Mueller, Nora; Avota, Elita; Collenburg, Lena; Grassme, Heike; Schneider-Schaulies, Sibylle (2014): Neutral sphingomyelinase in physiological and measles virus induced T cell suppression. In: *PLoS pathogens* 10 (12), e1004574. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004574.
- Muhlebach, Michael D.; Mateo, Mathieu; Sinn, Patrick L.; Prufer, Steffen; Uhlig, Katharina M.; Leonard, Vincent H. J. et al. (2011): Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. In: *Nature* 480 (7378), S. 530–533. DOI: 10.1038/nature10639.
- Muller, Nora; Avota, Elita; Schneider-Schaulies, Jurgen; Harms, Harry; Krohne, Georg; Schneider-Schaulies, Sibylle (2006): Measles virus contact with T cells impedes cytoskeletal remodeling associated with spreading, polarization, and CD3 clustering. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7 (7), S. 849–858. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2006.00426.x.
- Murata, N.; Sato, K.; Kon, J.; Tomura, H.; Yanagita, M.; Kuwabara, A. et al. (2000): Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. In: *The Biochemical journal* 352 Pt 3, S. 809–815.

- Naik, Shalin H.; Perie, Leila; Swart, Erwin; Gerlach, Carmen; van Rooij, Nienke; Boer, Rob J. de; Schumacher, Ton N. (2013): Diverse and heritable lineage imprinting of early haematopoietic progenitors. In: *Nature* 496 (7444), S. 229–232. DOI: 10.1038/nature12013.
- Naim, H. Y.; Ehler, E.; Billeter, M. A. (2000): Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. In: *The EMBO journal* 19 (14), S. 3576–3585. DOI: 10.1093/emboj/19.14.3576.
- Naniche, D.; Varior-Krishnan, G.; Cervoni, F.; Wild, T. F.; Rossi, B.; Rabourdin-Combe, C.; Gerlier, D. (1993): Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. In: *Journal of virology* 67 (10), S. 6025–6032.
- Nelson, Ashley N.; Putnam, Nicole; Hauer, Debra; Baxter, Victoria K.; Adams, Robert J.; Griffin, Diane E. (2017): Evolution of T Cell Responses during Measles Virus Infection and RNA Clearance. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 11474. DOI: 10.1038/s41598-017-10965-z.
- Nikolova-Karakashian, Mariana; Karakashian, Alexander; Rutkute, Kristina (2008): Role of neutral sphingomyelinases in aging and inflammation. In: *Sub-cellular biochemistry* 49, S. 469–486. DOI: 10.1007/978-1-4020-8831-5_18.
- Nishiuma, Teruaki; Nishimura, Yoshihiro; Okada, Taro; Kuramoto, Emi; Kotani, Yoshikazu; Jahangeer, Saleem; Nakamura, Shun-ichi (2008): Inhalation of sphingosine kinase inhibitor attenuates airway inflammation in asthmatic mouse model. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 294 (6), L1085-93. DOI: 10.1152/ajplung.00445.2007.
- Nobes, C.; Marsh, M. (2000): Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? In: *Current biology : CB* 10 (20), R739-41.
- Nowatari, Takeshi; Murata, Soichiro; Nakayama, Ken; Sano, Naoki; Maruyama, Takehito; Nozaki, Reiji et al. (2015): Sphingosine 1-phosphate has anti-apoptotic effect on liver sinusoidal endothelial cells and proliferative effect on hepatocytes in a paracrine manner in human. In: *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 45 (11), S. 1136–1145. DOI: 10.1111/hepr.12446.

- Noyce, Ryan S.; Bondre, Daniel G.; Ha, Michael N.; Lin, Liang-Tzung; Sisson, Gary; Tsao, Ming-Sound; Richardson, Christopher D. (2011): Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. In: *PLoS pathogens* 7 (8), e1002240. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002240.
- Ochi, Sadayuki; Oda, Masataka; Matsuda, Hisaaki; Ikari, Syusuke; Sakurai, Jun (2004): Clostridium perfringens alpha-toxin activates the sphingomyelin metabolism system in sheep erythrocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (13), S. 12181–12189. DOI: 10.1074/jbc.M307046200.
- Okada, H.; Kobune, F.; Sato, T. A.; Kohama, T.; Takeuchi, Y.; Abe, T. et al. (2000): Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. In: *Archives of virology* 145 (5), S. 905–920.
- Okada, Takaharu; Cyster, Jason G. (2007): CC chemokine receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (5), S. 2973–2978.
- Ono, Yoshikazu; Kurano, Makoto; Ohkawa, Ryunosuke; Yokota, Hiromitsu; Igarashi, Koji; Aoki, Junken et al. (2013): Sphingosine 1-phosphate release from platelets during clot formation: close correlation between platelet count and serum sphingosine 1-phosphate concentration. In: *Lipids in health and disease* 12, S. 20. DOI: 10.1186/1476-511X-12-20.
- Osawa, Yosuke; Suetsugu, Atsushi; Matsushima-Nishiwaki, Rie; Yasuda, Ichiro; Saibara, Toshiji; Moriwaki, Hisataka et al. (2013): Liver acid sphingomyelinase inhibits growth of metastatic colon cancer. In: *The Journal of clinical investigation* 123 (2), S. 834–843. DOI: 10.1172/JCI65188.
- Paik, J. H.; Chae, Ss; Lee, M. J.; Thangada, S.; Hla, T. (2001): Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (15), S. 11830–11837. DOI: 10.1074/jbc.M009422200.
- Palma, Clara de; Meacci, Elisabetta; Perrotta, Cristiana; Bruni, Paola; Clementi, Emilio (2006): Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor alpha

through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26 (1), S. 99–105. DOI: 10.1161/01.ATV.0000194074.59584.42.

Palosaari, Heidi; Parisien, Jean-Patrick; Rodriguez, Jason J.; Ulane, Christina M.; Horvath, Curt M. (2003): STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. In: *Journal of virology* 77 (13), S. 7635–7644.

Papp, K. (1956): Experiments proving that the route of infection in measles is the contamination of the conjunctival mucosa. In: *Revue d'immunologie et de therapie antimicrobienne* 20 (1-2), S. 27–36.

Pappu, Rajita; Schwab, Susan R.; Cornelissen, Ivo; Pereira, Joao P.; Regard, Jean B.; Xu, Ying et al. (2007): Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. In: *Science (New York, N.Y.)* 316 (5822), S. 295–298. DOI: 10.1126/science.1139221.

Parks, C. L.; Lerch, R. A.; Walpita, P.; Wang, H. P.; Sidhu, M. S.; Udem, S. A. (2001): Analysis of the noncoding regions of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. In: *Journal of virology* 75 (2), S. 921–933. DOI: 10.1128/JVI.75.2.921-933.2001.

Patel, Minal K.; Dumolard, Laure; Nedelec, Yoann; Sodha, Samir V.; Steulet, Claudia; Gacic-Dobo, Marta et al. (2019): Progress Toward Regional Measles Elimination - Worldwide, 2000-2018. In: *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 68 (48), S. 1105–1111. DOI: 10.15585/mmwr.mm6848a1.

Patente, Thiago A.; Pinho, Mariana P.; Oliveira, Aline A.; Evangelista, Gabriela C. M.; Bergami-Santos, Patrícia C.; Barbuto, José A. M. (2018): Human Dendritic Cells. Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 3176. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03176.

Patterson, J. B.; Thomas, D.; Lewicki, H.; Billeter, M. A.; Oldstone, M. B. (2000): V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. In: *Virology* 267 (1), S. 80–89. DOI: 10.1006/viro.1999.0118.

- Peiser, Leanne; Mukhopadhyay, Subhankar; Gordon, Siamon (2002): Scavenger receptors in innate immunity. In: *Current opinion in immunology* 14 (1), S. 123–128.
- Petrova, Velislava N.; Sawatsky, Bevan; Han, Alvin X.; Laksono, Brigitta M.; Walz, Lisa; Parker, Edyth et al. (2019): Incomplete genetic reconstitution of B cell pools contributes to prolonged immunosuppression after measles. In: *Science immunology* 4 (41). DOI: 10.1126/sciimmunol.aay6125.
- Pettus, Benjamin J.; Bielawski, Jacek; Porcelli, Anna M.; Reames, Davis L.; Johnson, Korey R.; Morrow, Jason et al. (2003): The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (11), S. 1411–1421. DOI: 10.1096/fj.02-1038com.
- Pfaller, Christian K.; Radeke, Monte J.; Cattaneo, Roberto; Samuel, Charles E. (2014): Measles virus C protein impairs production of defective copyback double-stranded viral RNA and activation of protein kinase R. In: *Journal of virology* 88 (1), S. 456–468. DOI: 10.1128/JVI.02572-13.
- Pham, Trung H. M.; Okada, Takaharu; Matloubian, Mehrdad; Lo, Charles G.; Cyster, Jason G. (2008): S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress. In: *Immunity* 28 (1), S. 122–133. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.11.017.
- Piqueras, Bernard; Connolly, John; Freitas, Heidi; Palucka, Anna Karolina; Banchereau, Jacques (2006): Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. In: *Blood* 107 (7), S. 2613–2618. DOI: 10.1182/blood-2005-07-2965.
- Pirquet, C.P von (1908): Das Verhalten der kutanen tuberculin Reaktion Während der Masern. In: *Dtsch Med Wochenschr.* (34), S. 1297–1300.
- Pitson, Stuart M.; Moretti, Paul A. B.; Zebol, Julia R.; Lynn, Helen E.; Xia, Pu; Vadas, Mathew A.; Wattenberg, Binks W. (2003): Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. In: *The EMBO journal* 22 (20), S. 5491–5500. DOI: 10.1093/emboj/cdg540.

- Plempner, Richard K.; Hammond, Anthea L.; Gerlier, Denis; Fielding, Adele K.; Cattaneo, Roberto (2002): Strength of envelope protein interaction modulates cytopathicity of measles virus. In: *Journal of virology* 76 (10), S. 5051–5061.
- Poti, Francesco; Gualtieri, Fabio; Sacchi, Sandro; Weissen-Plenz, Gabriele; Varga, Georg; Brodde, Martin et al. (2013): KRP-203, sphingosine 1-phosphate receptor type 1 agonist, ameliorates atherosclerosis in LDL-R^{-/-} mice. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33 (7), S. 1505–1512. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.301347.
- Proia, Richard L.; Hla, Timothy (2015): Emerging biology of sphingosine-1-phosphate. Its role in pathogenesis and therapy. In: *The Journal of clinical investigation* 125 (4), S. 1379–1387. DOI: 10.1172/JCI76369.
- Pulendran, B.; Banchereau, J.; Maraskovsky, E.; Maliszewski, C. (2001): Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. In: *Trends in immunology* 22 (1), S. 41–47.
- Pyne, Nigel J.; Pyne, Susan (2010): Sphingosine 1-phosphate and cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 10 (7), S. 489–503. DOI: 10.1038/nrc2875.
- Pyne, Nigel J.; Pyne, Susan (2013): Sphingosine 1-phosphate is a missing link between chronic inflammation and colon cancer. In: *Cancer cell* 23 (1), S. 5–7. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.12.005.
- Qi, Yanfei; Wang, Wei; Chen, Jinbiao; Dai, Lan; Kaczorowski, Dominik; Gao, Xin; Xia, Pu (2015): Sphingosine Kinase 1 Protects Hepatocytes from Lipotoxicity via Down-regulation of IRE1 α Protein Expression. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (38), S. 23282–23290. DOI: 10.1074/jbc.M115.677542.
- Ramos-Perez, Willy D.; Fang, Victoria; Escalante-Alcalde, Diana; Cammer, Michael; Schwab, Susan R. (2015): A map of the distribution of sphingosine 1-phosphate in the spleen. In: *Nature immunology* 16 (12), S. 1245–1252. DOI: 10.1038/ni.3296.
- Rathinasamy, Anchana; Czeloth, Niklas; Pabst, Oliver; Forster, Reinhold; Bernhardt, Gunter (2010): The origin and maturity of dendritic cells determine the pattern of sphingosine 1-phosphate receptors expressed and required for efficient migration. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (7), S. 4072–4081. DOI: 10.4049/jimmunol.1000568.

- Ray, J.; Fujinami, R. S. (1987): Characterization of in vitro transcription and transcriptional products of measles virus. In: *Journal of virology* 61 (11), S. 3381–3387.
- Riddell, Michaela A.; Moss, William J.; Hauer, Debra; Monze, Mwaka; Griffin, Diane E. (2007): Slow clearance of measles virus RNA after acute infection. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 39 (4), S. 312–317. DOI: 10.1016/j.jcv.2007.05.006.
- Romani, N.; Gruner, S.; Brang, D.; Kampgen, E.; Lenz, A.; Trockenbacher, B. et al. (1994): Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. In: *The Journal of experimental medicine* 180 (1), S. 83–93.
- Rota, P. A.; Bloom, A. E.; Vanchiere, J. A.; Bellini, W. J. (1994): Evolution of the nucleoprotein and matrix genes of wild-type strains of measles virus isolated from recent epidemics. In: *Virology* 198 (2), S. 724–730. DOI: 10.1006/viro.1994.1086.
- Ruwisch, L.; Schafer-Korting, M.; Kleuser, B. (2001): An improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of sphingosine-1-phosphate in complex biological materials. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 363 (3), S. 358–363.
- Salditt, Andreas; Koethe, Susanne; Pohl, Christine; Harms, Harry; Kolesnikova, Larissa; Becker, Stephan; Schneider-Schaulies, Sibylle (2010): Measles virus M protein-driven particle production does not involve the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) system. In: *The Journal of general virology* 91 (Pt 6), S. 1464–1472. DOI: 10.1099/vir.0.018523-0.
- Sallusto, F.; Lanzavecchia, A. (1994): Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. In: *The Journal of experimental medicine* 179 (4), S. 1109–1118.
- Sallusto, F.; Lanzavecchia, A. (2000): Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. In: *Immunological reviews* 177, S. 134–140.

- Sallusto, F.; Nicolo, C.; Maria, R. de; Corinti, S.; Testi, R. (1996): Ceramide inhibits antigen uptake and presentation by dendritic cells. In: *The Journal of experimental medicine* 184 (6), S. 2411–2416.
- Sallusto, F.; Palermo, B.; Lenig, D.; Miettinen, M.; Matikainen, S.; Julkunen, I. et al. (1999): Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. In: *European journal of immunology* 29 (5), S. 1617–1625. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1617::AID-IMMU1617>3.0.CO;2-3.
- Sallusto, F.; Schaerli, P.; Loetscher, P.; Schaniel, C.; Lenig, D.; Mackay, C. R. et al. (1998): Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. In: *European journal of immunology* 28 (9), S. 2760–2769. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2760::AID-IMMU2760>3.0.CO;2-N.
- Sanchez, Teresa; Hla, Timothy (2004): Structural and functional characteristics of S1P receptors. In: *Journal of cellular biochemistry* 92 (5), S. 913–922. DOI: 10.1002/jcb.20127.
- Sato, Hiroki; Yoneda, Misako; Honda, Tomoyuki; Kai, Chieko (2012): Morbillivirus receptors and tropism: multiple pathways for infection. In: *Frontiers in microbiology* 3, S. 75. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00075.
- Sato, T. A.; Enami, M.; Kohama, T. (1995): Isolation of the measles virus hemagglutinin protein in a soluble form by protease digestion. In: *Journal of virology* 69 (1), S. 513–516.
- Sato, T. A.; Kohama, T.; Sugiura, A. (1988): Intracellular processing of measles virus fusion protein. In: *Archives of virology* 98 (1-2), S. 39–50.
- Schall, T. J.; Bacon, K.; Toy, K. J.; Goeddel, D. V. (1990): Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. In: *Nature* 347 (6294), S. 669–671. DOI: 10.1038/347669a0.
- Schaper, Katrin; Kietzmann, Manfred; Baumer, Wolfgang (2014): Sphingosine-1-phosphate differently regulates the cytokine production of IL-12, IL-23 and IL-27 in

activated murine bone marrow derived dendritic cells. In: *Molecular immunology* 59 (1), S. 10–18. DOI: 10.1016/j.molimm.2013.11.015.

Scherer, Elias Q.; Yang, Jingli; Canis, Martin; Reimann, Katrin; Ivanov, Karolina; Diehl, Christian D. et al. (2010): Tumor necrosis factor-alpha enhances microvascular tone and reduces blood flow in the cochlea via enhanced sphingosine-1-phosphate signaling. In: *Stroke; a journal of cerebral circulation* 41 (11), S. 2618–2624. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.593327.

Schneider-Schaulies, Sibylle; Dittmer, Ulf (2006): Silencing T cells or T-cell silencing: concepts in virus-induced immunosuppression. In: *The Journal of general virology* 87 (Pt 6), S. 1423–1438. DOI: 10.1099/vir.0.81713-0.

Schnorr, J. J.; Xanthakos, S.; Keikavoussi, P.; Kampgen, E.; ter Meulen, V.; Schneider-Schaulies, S. (1997): Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (10), S. 5326–5331.

Schroder, Matthias; Richter, Cornelia; Juan, Martina Herrero San; Maltusch, Katrin; Giegold, Oliver; Quintini, Gianluca et al. (2011): The sphingosine kinase 1 and S1P1 axis specifically counteracts LPS-induced IL-12p70 production in immune cells of the spleen. In: *Molecular immunology* 48 (9-10), S. 1139–1148. DOI: 10.1016/j.molimm.2011.02.007.

Schuler, G.; Romani, N.; Steinman, R. M. (1985): A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells. In: *The Journal of investigative dermatology* 85 (1 Suppl), 99s-106s.

Schwab, Susan R.; Cyster, Jason G. (2007): Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. In: *Nature immunology* 8 (12), S. 1295–1301. DOI: 10.1038/ni1545.

Schwab, Susan R.; Pereira, Joao P.; Matloubian, Mehrdad; Xu, Ying; Huang, Yong; Cyster, Jason G. (2005): Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. In: *Science (New York, N.Y.)* 309 (5741), S. 1735–1739. DOI: 10.1126/science.1113640.

Schwiebs, Anja; Friesen, Olga; Katzy, Elisabeth; Ferreiros, Nerea; Pfeilschifter, Josef M.; Radeke, Heinfried H. (2016): Activation-Induced Cell Death of Dendritic Cells Is

Dependent on Sphingosine Kinase 1. In: *Frontiers in pharmacology* 7, S. 94. DOI: 10.3389/fphar.2016.00094.

Scimone, M. Lucila; Felbinger, Thomas W.; Mazo, Irina B.; Stein, Jens V.; Andrian, Ulrich H. von; Weninger, Wolfgang (2004): CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes. In: *The Journal of experimental medicine* 199 (8), S. 1113–1120. DOI: 10.1084/jem.20031645.

Segura, Elodie; Touzot, Maxime; Bohineust, Armelle; Cappuccio, Antonio; Chiocchia, Gilles; Hosmalin, Anne et al. (2013): Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. In: *Immunity* 38 (2), S. 336–348. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.10.018.

Segura, Elodie; Valladeau-Guilemond, Jenny; Donnadieu, Marie-Helene; Sastre-Garau, Xavier; Soumelis, Vassili; Amigorena, Sebastian (2012): Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. In: *The Journal of experimental medicine* 209 (4), S. 653–660. DOI: 10.1084/jem.20111457.

Senkal, Can E.; Ponnusamy, Suriyan; Bielawski, Jacek; Hannun, Yusuf A.; Ogretmen, Besim (2010): Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C16-ceramide via selective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (1), S. 296–308. DOI: 10.1096/fj.09-135087.

Servet-Delprat, C.; Vidalain, P. O.; Bausinger, H.; Manie, S.; Le Deist, F.; Azocar, O. et al. (2000): Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 (4), S. 1753–1760.

Shaffer, Jessica A.; Bellini, William J.; Rota, Paul A. (2003): The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. In: *Virology* 315 (2), S. 389–397.

Shakor, Abo Bakr Abdel; Taniguchi, Makoto; Kitatani, Kazuyuki; Hashimoto, Mayumi; Asano, Satoshi; Hayashi, Akira et al. (2011): Sphingomyelin synthase 1-generated sphingomyelin plays an important role in transferrin trafficking and cell proliferation.

In: *The Journal of biological chemistry* 286 (41), S. 36053–36062. DOI: 10.1074/jbc.M111.228593.

Shishkova, Yoanna; Harms, Harry; Krohne, Georg; Avota, Elita; Schneider-Schaulies, Sibylle (2007): Immune synapses formed with measles virus-infected dendritic cells are unstable and fail to sustain T cell activation. In: *Cellular microbiology* 9 (8), S. 1974–1986. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.00928.x.

Shu, Xiaodong; Wu, Weicheng; Mosteller, Raymond D.; Broek, Daniel (2002): Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. In: *Molecular and cellular biology* 22 (22), S. 7758–7768.

Siegal, F. P.; Kadowaki, N.; Shodell, M.; Fitzgerald-Bocarsly, P. A.; Shah, K.; Ho, S. et al. (1999): The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5421), S. 1835–1837.

Simmons, Szandor; Ishii, Masaru (2014): Sphingosine-1-phosphate: a master regulator of lymphocyte egress and immunity. In: *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* 62 (2), S. 103–115. DOI: 10.1007/s00005-013-0264-8.

Simonis, Alexander; Hebling, Sabrina; Gulbins, Erich; Schneider-Schaulies, Sibylle; Schubert-Unkmeir, Alexandra (2014): Differential activation of acid sphingomyelinase and ceramide release determines invasiveness of *Neisseria meningitidis* into brain endothelial cells. In: *PLoS pathogens* 10 (6), e1004160. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004160.

Simonis, Alexander; Schubert-Unkmeir, Alexandra (2018): The role of acid sphingomyelinase and modulation of sphingolipid metabolism in bacterial infection. In: *Biological chemistry* 399 (10), S. 1135–1146. DOI: 10.1515/hsz-2018-0200.

Singh, Brajesh K.; Li, Ni; Mark, Anna C.; Mateo, Mathieu; Cattaneo, Roberto; Sinn, Patrick L. (2016): Cell-to-Cell Contact and Nectin-4 Govern Spread of Measles Virus from Primary Human Myeloid Cells to Primary Human Airway Epithelial Cells. In: *Journal of virology* 90 (15), S. 6808–6817. DOI: 10.1128/JVI.00266-16.

Solano-Gálvez, Sandra Georgina; Tovar-Torres, Sonia Margarita; Tron-Gómez, María Sofía; Weiser-Smeke, Ariane Estrella; Álvarez-Hernández, Diego Abelardo; Franyuti-

- Kelly, Giorgio Alberto et al. (2018): Human Dendritic Cells. Ontogeny and Their Subsets in Health and Disease. In: *Medical sciences (Basel, Switzerland)* 6 (4). DOI: 10.3390/medsci6040088.
- Spiegel, Sarah; Milstien, Sheldon (2003): Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 4 (5), S. 397–407. DOI: 10.1038/nrm1103.
- Spiegel, Sarah; Milstien, Sheldon (2011): The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (6), S. 403–415. DOI: 10.1038/nri2974.
- Steinman, R. M. (2003): The control of immunity and tolerance by dendritic cell. In: *Pathologie-biologie* 51 (2), S. 59–60.
- Steinman, R. M.; Cohn, Z. A. (1973): Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. In: *The Journal of experimental medicine* 137 (5), S. 1142–1162.
- Steinman, Ralph M. (2007): Dendritic cells: understanding immunogenicity. In: *European journal of immunology* 37 Suppl 1, S53-60. DOI: 10.1002/eji.200737400.
- Stockwin, L. H.; McGonagle, D.; Martin, I. G.; Blair, G. E. (2000): Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. In: *Immunology and cell biology* 78 (2), S. 91–102. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2000.00888.x.
- Streilein, J. W.; Grammer, S. F. (1989): In vitro evidence that Langerhans cells can adopt two functionally distinct forms capable of antigen presentation to T lymphocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 143 (12), S. 3925–3933.
- Suryanarayana, K.; Baczko, K.; ter Meulen, V.; Wagner, R. R. (1994): Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. In: *Journal of virology* 68 (3), S. 1532–1543.
- Suzuki, Y. (1994): Gangliosides as influenza virus receptors. Variation of influenza viruses and their recognition of the receptor sialo-sugar chains. In: *Progress in lipid research* 33 (4), S. 429–457.

Swart, Rik L. de; Ludlow, Martin; Witte, Lot de; Yanagi, Yusuke; van Amerongen, Geert; McQuaid, Stephen et al. (2007): Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. In: *PLoS pathogens* 3 (11), e178. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030178.

Taha, Tarek A.; Mullen, Thomas D.; Obeid, Lina M. (2006): A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. In: *Biochimica et biophysica acta* 1758 (12), S. 2027–2036. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.10.018.

Tal, Orna; Lim, Hwee Ying; Gurevich, Irina; Milo, Idan; Shipony, Zohar; Ng, Lai Guan et al. (2011): DC mobilization from the skin requires docking to immobilized CCL21 on lymphatic endothelium and intralymphatic crawling. In: *The Journal of experimental medicine* 208 (10), S. 2141–2153. DOI: 10.1084/jem.20102392.

Tang, H. L.; Cyster, J. G. (1999): Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5415), S. 819–822.

Tatsuo, H.; Ono, N.; Tanaka, K.; Yanagi, Y. (2000): SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. In: *Nature* 406 (6798), S. 893–897. DOI: 10.1038/35022579.

Thudichum, John Louis William (1884): A treatise on the chemical constitution of the brain. Based throughout upon original researches. London.

Tober, C.; Seufert, M.; Schneider, H.; Billeter, M. A.; Johnston, I. C.; Niewiesk, S. et al. (1998): Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. In: *Journal of virology* 72 (10), S. 8124–8132.

Venkataraman, Krishnan; Lee, Yong-Moon; Michaud, Jason; Thangada, Shobha; Ai, Youxi; Bonkovsky, Herbert L. et al. (2008): Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. In: *Circulation research* 102 (6), S. 669–676. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.165845.

Verhasselt, V.; Buelens, C.; Willems, F.; Groote, D. de; Haeffner-Cavaillon, N.; Goldman, M. (1997): Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood

- dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 158 (6), S. 2919–2925.
- Vijayan, Madhuvanthi; Seo, Young-Jin; Pritzl, Curtis John; Squires, Sarah Angela; Alexander, Stephen; Hahm, Bumsuk (2014): Sphingosine kinase 1 regulates measles virus replication. In: *Virology* 450-451, S. 55–63. DOI: 10.1016/j.virol.2013.11.039.
- Vincent, S.; Gerlier, D.; Manie, S. N. (2000): Measles virus assembly within membrane rafts. In: *Journal of virology* 74 (21), S. 9911–9915.
- Visentin, Barbara; Vekich, John A.; Sibbald, Bradley J.; Cavalli, Amy L.; Moreno, Kelli M.; Matteo, Rosalia G. et al. (2006): Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. In: *Cancer cell* 9 (3), S. 225–238. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.02.023.
- Vries, Rory D. de; Lemon, Ken; Ludlow, Martin; McQuaid, Stephen; Yuksel, Selma; van Amerongen, Geert et al. (2010): In vivo tropism of attenuated and pathogenic measles virus expressing green fluorescent protein in macaques. In: *Journal of virology* 84 (9), S. 4714–4724. DOI: 10.1128/JVI.02633-09.
- Vries, Rory D. de; McQuaid, Stephen; van Amerongen, Geert; Yuksel, Selma; Verburch, R. Joyce; Osterhaus, Albert D M E et al. (2012): Measles immune suppression: lessons from the macaque model. In: *PLoS pathogens* 8 (8), e1002885. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002885.
- Vries, Rory D. de; Swart, Rik L. de (2014): Measles immune suppression: functional impairment or numbers game? In: *PLoS pathogens* 10 (12), e1004482. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004482.
- Walzer, Thierry; Chiossone, Laura; Chaix, Julie; Calver, Andrew; Carozzo, Claude; Garrigue-Antar, Laure et al. (2007): Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. In: *Nature immunology* 8 (12), S. 1337–1344. DOI: 10.1038/ni1523.
- Weber, Michele; Hauschild, Robert; Schwarz, Jan; Moussion, Christine; Vries, Ingrid de; Legler, Daniel F. et al. (2013): Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic

chemokine gradients. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6117), S. 328–332. DOI: 10.1126/science.1228456.

WHO/EURO (2019): Strategic Response Plan for the measles emergency in the WHO European Region. September 2019 - December 2020. WHO. Kopenhagen. Online verfügbar unter http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/414182/WHO-Measles-Emergency-v8a_hires_pages.pdf?ua=1, zuletzt geprüft am 04.01.2020.

Wild, T. F.; Malvoisin, E.; Buckland, R. (1991): Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. In: *The Journal of general virology* 72 (Pt 2), S. 439–442. DOI: 10.1099/0022-1317-72-2-439.

Witte, Lot de; Abt, Marion; Schneider-Schaulies, Sibylle; van Kooyk, Yvette; Geijtenbeek, Teunis B. H. (2006): Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. In: *Journal of virology* 80 (7), S. 3477–3486. DOI: 10.1128/JVI.80.7.3477-3486.2006.

Witte, Lot de; Vries, Rory D. de; van der Vlist, Michiel; Yuksel, Selma; Litjens, Manja; Swart, Rik L. de; Geijtenbeek, Teunis B. H. (2008): DC-SIGN and CD150 have distinct roles in transmission of measles virus from dendritic cells to T-lymphocytes. In: *PLoS pathogens* 4 (4), e1000049. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000049.

Worbs, Tim; Mempel, Thorsten R.; Bolter, Jasmin; Andrian, Ulrich H. von; Forster, Reinhold (2007): CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. In: *The Journal of experimental medicine* 204 (3), S. 489–495. DOI: 10.1084/jem.20061706.

Yahi, N.; Baghdiguian, S.; Moreau, H.; Fantini, J. (1992): Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. In: *Journal of virology* 66 (8), S. 4848–4854.

Yamane, Daisuke; Zahoor, Muhammad A.; Mohamed, Yassir M.; Azab, Walid; Kato, Kentaro; Tohya, Yukinobu; Akashi, Hiroomi (2009): Inhibition of sphingosine kinase by bovine viral diarrhea virus NS3 is crucial for efficient viral replication and cytopathogenesis. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (20), S. 13648–13659. DOI: 10.1074/jbc.M807498200.

- Yatomi, Y.; Ohmori, T.; Rile, G.; Kazama, F.; Okamoto, H.; Sano, T. et al. (2000): Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. In: *Blood* 96 (10), S. 3431–3438.
- Yatomi, Y.; Yamamura, S.; Ruan, F.; Igarashi, Y. (1997): Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (8), S. 5291–5297.
- Yu, Xuelian; Shahriari, Shadi; Li, Hong-Mei; Ghildyal, Reena (2016): Measles Virus Matrix Protein Inhibits Host Cell Transcription. In: *PloS one* 11 (8), e0161360. DOI: 10.1371/journal.pone.0161360.
- Yuyama, Kohei; Sun, Hui; Mitsutake, Susumu; Igarashi, Yasuyuki (2012): Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid-beta by microglia. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (14), S. 10977–10989. DOI: 10.1074/jbc.M111.324616.
- Zamora-Pineda, Jesus; Kumar, Ashok; Suh, Jung H.; Zhang, Meng; Saba, Julie D. (2016): Dendritic cell sphingosine-1-phosphate lyase regulates thymic egress. In: *The Journal of experimental medicine* 213 (12), S. 2773–2791. DOI: 10.1084/jem.20160287.
- Zhang, H.; Desai, N. N.; Olivera, A.; Seki, T.; Brooker, G.; Spiegel, S. (1991): Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. In: *The Journal of cell biology* 114 (1), S. 155–167.
- Zhang, Xiaoi; Lu, Guangwen; Qi, Jianxun; Li, Yan; He, Yan; Xu, Xiang et al. (2013): Structure of measles virus hemagglutinin bound to its epithelial receptor nectin-4. In: *Nature structural & molecular biology* 20 (1), S. 67–72. DOI: 10.1038/nsmb.2432.
- Zimmerman, Laura A.; Muscat, Mark; Singh, Simarjit; Ben Mamou, Myriam; Jankovic, Dragan; Datta, Siddhartha et al. (2019): Progress Toward Measles Elimination - European Region, 2009-2018. In: *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 68 (17), S. 396–401. DOI: 10.15585/mmwr.mm6817a4.
- Zlotnik, Albert; Yoshie, Osamu (2012): The chemokine superfamily revisited. In: *Immunity* 36 (5), S. 705–716. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.05.008.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies für die Möglichkeit, mit diesem interessanten Thema in ihrer Arbeitsgruppe mitzuwirken, das damit verbundene Vertrauen, die gute Betreuung und ihre konstruktive kritische Betrachtungsweise

Prof. Dr. Alexandra Schubert-Unkmeir für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens

Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies für seine Diskussionsbeiträge und Anregungen im Literaturseminar und in den Besprechungen

Prof. Dr. Kleuser und Prof. Dr. Japtok für die Zusammenarbeit bei den intrazellulären Sphingolipidanalysen

Dr. Elita Avota für die in meine Einarbeitung investierte Zeit, ihre hilfreichen Ideen, die bereichernden fachlichen (und auch politischen) Diskussionen und die schönen Monate im Labor

Dr. Lena Collenburg für ihr Mitwirken zum Gelingen der Arbeit, die guten Anregungen und die gemeinsame Zeit

Dr. Nora Müller für ihre Hilfe am konfokalen Mikroskop

meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor, insbesondere Elita Avota, Charlene Börtlein, Philipp Kible, Lena Collenburg, Shaghayegh Derakhshani und Claudia Hollmann für ihren Beitrag zu dieser lehrreichen, besonderen und sehr schönen Zeit

der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Würzburg für die Bereitstellung der Leukozytendepletionsfilter

Abschließend möchte ich meiner Familie Gisela, Christoph, Anna-Lena und Laura Pilgram, sowie Tim Lehmann herzlich danken. Erst durch ihre Unterstützung konnte ich meine Ziele und damit mein Studium und diese Arbeit verwirklichen.

Veröffentlichung

Derakhshani, Shaghayegh; Kurz, Andreas; Japtok, Lukasz; Schumacher, Fabian; **Pilgram, Lisa**; Steinke, Maria et al. (2019): Measles Virus Infection Fosters Dendritic Cell Motility in a 3D Environment to Enhance Transmission to Target Cells in the Respiratory Epithelium. *Frontiers in immunology* 10, S. 1294.