

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Institut für Virologie und Immunbiologie



Modulation CD4⁺ humaner Treg- und Tconv-Zellen durch Inhibition der
sauren Sphingomyelinase in vitro

Modulation of CD4⁺ human Treg and Tconv cells by inhibition of the acid
sphingomyelinase in vitro

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infektion und Immunität

vorgelegt von
Fabio Stefan Dennstädt
geboren in Roth

Würzburg 2019

Eingereicht am:.....

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Philip Tovote

1. Betreuer: Priv. Doz. Dr. med. Niklas Beyersdorf

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

3. Betreuer: Priv. Doz. Dr. med. Mathias Buttman

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	1
Inhaltsverzeichnis	2
1 Einleitung	5
1.1 T-Lymphozyten	5
1.1.1 Die verschiedenen Subpopulationen von T-Zellen	6
1.1.2 Bildung und Entwicklung von T-Zellen	6
1.1.3 Regulatorische T-Zellen	8
1.2 Sphingolipide	11
1.2.1 Der Sphingolipidstoffwechsel	11
1.2.2 Ceramid als ein bioaktives Lipid	12
1.2.3 Sphingomyelinasen	13
1.3 Die saure Sphingomyelinase	14
1.3.1 Lysosomale und sezernierte Form der ASM	14
1.3.2 Bedeutung der ASM bei verschiedenen Krankheitsbil- dern	16
1.3.3 Pharmakologische Hemmung	21
1.4 Bioaktive Lipide und ASM in T-Zellen	24
1.4.1 Signalwege der T-Zell-Aktivierung	24
1.4.2 Molekulare Angriffspunkte der Sphingolipide	25
1.4.3 Effekte der ASM auf T-Zellen	26
1.5 Sertralin und Citalopram	27
1.6 Ziele der Arbeit	28
2 Material und Methoden	29
2.1 Verwendetes Material	29
2.2 Angewandte Methoden	34
3 Ergebnisse	42
3.1 Pharmakologische Hemmung der ASM in Mäusen	42
3.1.1 ASM-Inhibition durch Sertralin und Citalopram	42

3.1.2	Erhöhung der Treg-Zellfrequenzen durch ASM-Inhibition	43
3.2	Inhibition der ASM im Menschen	46
3.2.1	Hemmung der ASM in CD4 ⁺ T-Zellen	46
3.2.2	Hemmung der ASM in Tconv- und Treg-Zellen	47
3.3	Etablierung in vitro Assay human	48
3.3.1	Behandlung humaner PBMCs mit Sertralin und Citalopram	48
3.3.2	Kultivierung humaner PBMCs mit ASM-Inhibitoren in Anwesenheit von IL-2	50
3.3.3	Inhibitorabhängige Effekte auf Treg- und Tconv-Zellen bei Kultivierung mit α CD3-Antikörper	51
3.4	ASM-Inhibition unter Stimulation mit einem α CD28-Antikörper	55
3.5	Fehlende Vermehrung regulatorischer T-Zellen nach vorheriger Treg-Zellepletion	56
3.6	Bedeutung von Ceramid für regulatorische und konventionelle T-Zellen	57
3.6.1	Verminderte Menge an regulatorischen T-Zellen in Anwesenheit von C6-Ceramid	57
3.6.2	Der kompetitive ASM-Inhibitor ARC39 nimmt keinen Einfluss auf die beobachteten Effekte	60
3.7	Funktionelle Effekte der ASM-Inhibitoren auf Gedächtnis-T-Zellen	62
4	Diskussion	66
4.1	Hemmung der sauren Sphingomyelinase durch Antidepressiva	66
4.1.1	Antidepressive Wirkung durch ASM-Inhibition	66
4.1.2	ASM-Hemmung durch Sertralin und Citalopram	67
4.2	Treg-Zellaktivierung durch ASM-Inhibition in der Maus	68
4.3	Modulation menschlicher Immunzellen	69
4.3.1	Erhöhung der Treg-Zellfrequenz durch ASM-Inhibition ohne zusätzliche Stimulantien	69
4.3.2	ASM-Inhibition bei gleichzeitiger Stimulation der Immunzellen	70
4.3.3	Modulation α CD3-aktivierter T-Zellen durch ASM-Inhibition	72
4.3.4	Untersuchung von Ceramid und ASM	74
4.3.5	Auswirkungen der ASM-Inhibitoren auf die Effektorfunktionen von Gedächtnis-T-Zellen	77
4.3.6	ASM-Inhibitoren als neue immunmodulatorische Medikamente	79
4.3.7	Offene Fragen und Zukünftige Forschung	81

5 Zusammenfassung	82
6 Summary	84
Literaturverzeichnis	86
Abbildungsverzeichnis	98
Abkürzungsverzeichnis	100
Danksagung	102

1. Einleitung

1.1 T-Lymphozyten

Das adaptive Immunsystem erweitert die Möglichkeiten der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr um zusätzliche Abwehrmechanismen gegen sich verändernde und neue Krankheitserreger. Von den antigenpräsentierenden Zellen (APC) einmal abgesehen, begründet es sich auf die zellulären Reaktionen von B- und T-Lymphozyten. Während B-Zellen durch Produktion von Antikörpern vorwiegend die humorale Immunreaktion auslösen, sind die T-Zellen für zellvermittelte Abwehrreaktionen verantwortlich. Eine dritte Lymphozytenpopulation stellen die natürlichen Killer Zellen (NK-Zelle) dar, welche zytotoxische Reaktionen gegen virusinfizierte Zellen und Tumorzellen ausüben (vgl. [1], [2]).

Eine zentrale und regulierende Rolle im adaptiven Immunsystem nehmen die T-Zellen ein, da sie durch Interaktion mit den anderen Immunzellen das Abwehrgeschehen gezielt steuern können.

Wesentlich hierfür ist der T-Zell-Rezeptor (TCR), ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Proteinkomplex, der von allen T-Zellen exprimiert wird. Der TCR ermöglicht die Erkennung von Antigenen auf MHC-Molekülen an der Oberfläche anderer Zellen und löst über verschiedene Proteine, die als CD3 zusammengefasst werden, intrazelluläre Signale aus. Für eine volle Aktivierung einer T-Zelle durch eine antigenpräsentierende Zelle ist zusätzlich noch die Stimulation über den kostimulatorischen Rezeptor CD28 erforderlich. Dieser Rezeptor bindet an B7.1 (=CD80) und B7.2 (=CD86), wodurch das TCR-Signal verstärkt wird und intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt werden [3]. Durch eine solche Aktivierung erhält die T-Zelle die Möglichkeit, auf ein Antigen zu reagieren und eine adäquate Immunreaktion auszulösen.

1.1.1 Die verschiedenen Subpopulationen von T-Zellen

Anhand von Oberflächenmarkern lassen sich die T-Zellen weiter in $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen (CTL) und $CD4^+$ T-Helfer-Zellen (TH) unterteilen. CTLs können über den $CD8$ -Rezeptor MHC-I-Moleküle binden und nach Erkennung eines entsprechenden Antigens, durch die Freisetzung von Perforin und Granzym, sowie durch Induktion von Apoptose schadhafte Zellen eliminieren.

Die T-Helfer-Zellen hingegen sind nicht direkt an der Beseitigung von Pathogenen beteiligt, sondern steuern durch Rezeptorinteraktionen mit anderen Immunzellen und durch Freisetzung von Zytokinen den Ablauf der Immunantwort.

Funktionell können die T-Helfer-Zellen in TH1, TH2, TH17, und regulatorische T-Zellen eingeteilt werden.

TH1-Zellen aktivieren durch Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-2, $IFN-\gamma$ und TNF Makrophagen, wodurch intrazelluläre Krankheitserreger beseitigt werden können. Demgegenüber blockieren die TH2-Zellen durch IL-4 die Aktivität von Makrophagen und aktivieren außerdem durch IL-4 und IL-5 B-Lymphozyten. Über diesen Mechanismus werden extrazelluläre Krankheitserreger wie Parasiten beseitigt. Je nachdem, welcher dieser beiden T-Zell-Typen maßgebend ist, spricht man auch von einer Typ-1 oder Typ-2-Immunantwort (vgl. [2]).

TH17-Zellen sezernieren das namensgebende Zytokin IL-17 und aktivieren neutrophile Granulozyten, wodurch extrazelluläre Mikroorganismen wie pathogene Pilze bekämpft werden [1], [4].

Eine weitere Population $CD4^+$ T-Zellen bildet die Gruppe der regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen), welche großen Einfluss auf die Aktivität und das Verhalten anderer Immunzellen nehmen. Diese Zellen exprimieren zusätzlich noch den Aktivierungsmarker CD25 und den Transkriptionsfaktor "forkhead box protein 3" (Foxp3). In Abgrenzung zu den Treg-Zellen werden alle nicht-regulatorischen T-Zellen als "konventionelle T-Zellen" (Tconv-Zellen) zusammengefasst.

1.1.2 Bildung und Entwicklung von T-Zellen

Reifung von T-Zellen im Thymus

Die T-Zell-Bildung geht zunächst von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark aus, woraufhin sich weitere Entwicklungsschritte im Thymus anschließen. Im Bereich des Thymuscortex erfolgen dabei Wechselwirkungen mit den Thymusepithelzellen, wodurch die, nun als Thymozyten bezeichneten Zellen, über Oberflächenrezeptoren Differenzierungssignale erhalten. Nach dem Durchlaufen einiger doppelt-negativer Reifestadien, in denen die

Zellen weder den CD4-noch den CD8-Korezeptor exprimieren, erfolgt die Expression beider Marker und die Zellen sind doppelt positiv.

Anschließend erfolgt eine positive Selektion all jener Zellen, die in der Lage sind, MHC-Moleküle an der Oberfläche zu erkennen. In Folge dessen verbleibt entweder der CD4-Korezeptor für T-Helfer-Zellen, der MHC-II-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen binden kann, oder der CD8-Korezeptor für die CTLs, der die MHC-I-Moleküle auf allen kernhaltigen Körperzellen erkennt. Im Anschluss werden noch T-Zellen, die gegen körpereigene Antigene reagieren, im Rahmen der negativen Selektion beseitigt (vgl. [2], [5]).

Zelldifferenzierung

Nach dem Selektionsprozess im Thymus verbleiben naive $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen, die dann über die Blutbahn zu den sekundär lymphatischen Organen gelangen. Wird einer $CD4^+$ TH-Zelle schließlich durch eine dendritische Zelle ein entsprechendes Antigen präsentiert, löst dies eine T-Zell-Antwort aus, wodurch es zur Proliferation und zur Differenzierung des T-Lymphozyten kommt.

Zu Beginn steht dabei die Bildung der “immunologischen Synapse“, jener komplex organisierten Kontaktstelle zwischen T-Zelle und APC, in welcher sich der T-Zell-Rezeptor, sowie der Korezeptor CD4 an ein MHC-II-Molekül der aktivierten APC binden. Ein zusätzliches Signal wird durch die Bindung der B7-Proteine CD80 und CD86 an den CD28-Rezeptor der T-Zelle vermittelt [2], [3]. In Folge dessen kommt es durch Bildung von IL-2 und der Heraufregulierung von CD25 zur klonalen Expansion der TH-Zelle.

Zu welcher Subpopulation die Zelle sich schließlich differenziert, hängt davon ab, welche Zytokine von der APC, aber auch von der T-Zelle selbst, gebildet werden (vgl. auch Abbildung 1.1). Darüber hinaus ist die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren nötig, damit sich eine TH-Zelle in eine entsprechende Richtung entwickelt.

TH1-Zellen etwa werden in Anwesenheit von IL-12 und $IFN-\gamma$ durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren T-bet und STAT4 (signal transducer and activator of transcription) gebildet. Die Abwesenheit von IL-12 hingegen und das Vorhandensein verschiedener Zytokine (u.a. IL-4, IL-2, IL-7) induzieren über GATA-3 und STAT5 die Differenzierung zu TH2-Zellen. Bei der Entstehung von TH17-Zellen wiederum fehlen diese Zytokine, während die Gegenwart von IL-6 und $TGF-\beta$, sowie die Aktivierung von $ROR\gamma t$ und STAT3 erforderlich ist. [2],[6]

Im Rahmen einer solchen Differenzierung von T-Zellen entstehen sowohl Effektor-T-Zellen, die unmittelbar an der Immunantwort teilnehmen, als auch Gedächtnis-T-Zellen, die für mehrere Jahre im Körper verbleiben können.

Bei erneuter Konfrontation mit dem spezifischen Antigen kann so eine neue Immunreaktion sehr viel schneller erfolgen.

1.1.3 Regulatorische T-Zellen

Funktion

Den Treg-Zellen kommt innerhalb des Immunsystems eine Sonderrolle zu, da sie unter anderem immunsuppressive Wirkungen ausüben und das Ausmaß einer Immunreaktion regulieren. Zum einen wirken sie so einer übersteigerten Immunantwort entgegen und hemmen zum anderen Immunzellen, die auf körpereigene Antigene reagieren.

Die Beseitigung solcher autoreaktiver B- und T-Lymphozyten in Knochenmark und Thymus durch negative Selektion im Rahmen des Reifungsprozesses stellt die "zentrale Toleranz" dar. Daneben muss aber auch eine "periphere Toleranz" im Körper sichergestellt werden, was fundamental durch die regulatorischen T-Zellen erfolgt [7]. Auf diese Weise verhindern die Treg-Zellen auch die Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Bei bestimmten Krankheitsbildern können interessanterweise quantitative oder qualitative Veränderungen der regulatorischen T-Zellen festgestellt werden [8].

Weiterhin sind Treg-Zellen für die Eingrenzung von chronischen Entzündungsprozessen und Allergien verantwortlich [9]. Umgekehrt können regulatorische T-Zellen dem Körper jedoch auch schaden, indem sie wichtige Immunantworten inhibieren und so beispielsweise Angriffe des Immunsystems gegen Tumorzellen unterbinden [10].

Charakterisierung

An der Oberfläche tragen Treg-Zellen die α -Kette des IL-2 Rezeptors (=CD25) und sind darüber bezüglich Wachstum und Proliferation von IL-2 abhängig [11]. CD25 kann aber auch von konventionellen T-Zellen exprimiert werden, da sie diesen Rezeptor im Zuge einer T-Zellaktivierung hoch regulieren.

Weiterhin wird von den Treg-Zellen der auf dem X-Chromosom codierte Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimiert. Wenngleich noch nicht vollständig geklärt ist, welche Rolle genau dieses Protein im Signalnetzwerk der Zelle einnimmt, steht fest, dass es für Funktion und Entwicklung der regulatorischen T-Zellen von elementarer Bedeutung ist [12].

So sind bei einem Defekt des Gens die regulatorischen T-Zellen nicht mehr funktionsfähig und es kommt zum IPEX-Syndrom (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome) [13]. Dabei handelt es sich um eine schwere genetische Krankheit, bei der schon im Neugeborenenalter gleichzeitig mehrere Autoimmunerkrankungen parallel auftreten.

Mithilfe von CD25 und Foxp3 können die Treg-Zellen identifiziert werden,

obgleich diese Marker nicht vollkommen spezifisch für regulatorische T-Zellen sind und mitunter auch bei Tconv-Zellen vorkommen können [1], [14]. Ein weiteres Protein, das besonders von Treg-Zellen gebildet wird, ist CTLA-4 (=cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4, =CD152). So wie auch CD28 bindet es an die B7-Moleküle CD80/CD86, wirkt aber genau entgegengesetzt: Während CD28 in der T-Zelle ein aktivierendes Signal vermittelt, wirkt CTLA-4 hier inhibitorisch. Darüber hinaus sind regulatorische T-Zellen durch eine hohe Expression von GITR (glucocorticoide induced necrosis factor) und LAG-3 (lymphocyte activation gene-3), sowie durch eine niedrige Expression von CD127 charakterisiert [2].

Keiner der genannten Marker kommt jedoch exklusiv nur auf regulatorischen T-Zellen vor. Dennoch lassen sich Treg-Zellen durch Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie identifizieren und werden in den meisten Untersuchungen als Zellpopulation von CD25⁺ Foxp3⁺ T-Zellen erkannt.

Nach dem Aktivierungszustand können die Zellen noch in ruhende CD45RA⁺ Foxp3^{low} und aktivierte CD45RA⁻ Foxp3^{high} Treg-Zellen unterteilt werden [15].

Treg-Reifung

Obwohl keine eindeutigen Marker zur weiteren Klassifizierung der regulatorischen T-Zellen existieren, werden noch natürliche Treg-Zellen (nTreg) von induzierbaren Treg-Zellen (iTreg) unterschieden. Die nTreg-Zellen entstehen durch positive Selektion im Thymus mittels Interaktion zwischen TCR und MHC-Molekülen. Besondere Bedeutung haben bei der Treg-Reifung kostimulatorische Signale, die durch den CD28-Korezeptor vermittelt werden [16], [17]. Außerdem ist die Expression von Foxp3 durch die Zellen für eine erfolgreiche Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen essentiell [12].

Während nTreg-Zellen vorwiegend gegen körpereigene Antigene gerichtet sind, reagieren iTreg-Zellen vornehmlich auf Fremdanigene [2]. Sie entstehen in der Peripherie aus naiven T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β . iTreg und nTreg sind verschiedene Formen regulatorischer T-Zellen mit vielen gemeinsamen Aufgaben und Charakteristika. Es handelt sich jedoch um keine absolut identischen Zelltypen, die sich lediglich aufgrund ihrer Bildung unterscheiden lassen [8].

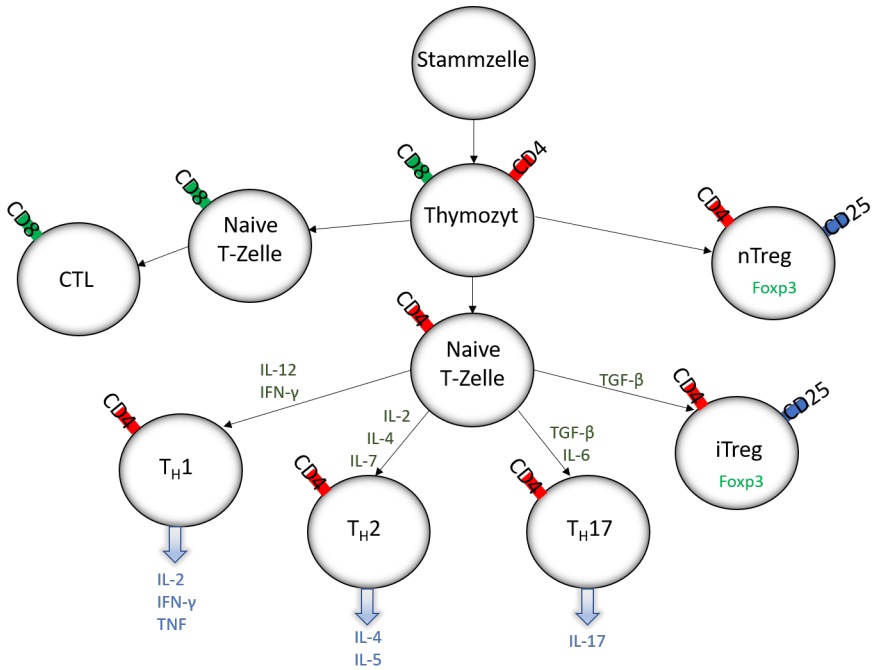


Abb. 1.1: Grafische Abbildung der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen.

Wenngleich die regulatorischen T-Zellen daher eine heterogene Gruppe unterschiedlicher Zellen darstellen, übernehmen doch alle Untergruppen der Treg-Zellen durch Regulation und Suppression des Immunsystems ähnliche Funktionen und werden daher zusammenfassend betrachtet.

Suppression des Immunsystems

Regulatorische T-Zellen besitzen verschiedene Möglichkeiten zur Suppression des Immunsystems. Ein Schlüsselmechanismus ist die Freisetzung der antiinflammatorischen Zytokine IL-10, TGF β und IL-35. Obwohl eindeutig nachgewiesen werden kann, dass diese Moleküle die Funktion von Effektorzellen des Immunsystems inhibieren, ist ungeklärt, welche Bedeutung die einzelnen Zytokine in bestimmten Situationen und bei bestimmten Pathologien besitzen [18].

Weiterhin können Treg-Zellen andere Zellen durch Abgabe von Granzym und Perforin lysieren. Durch Vernichtung von B-Lymphozyten kann so beispielsweise eine B-Zell-Antwort gehemmt werden [19]. Regulatorische T-Zellen können über diesen Mechanismus auch die Beseitigung von Tumorzellen verhindern, indem sie NK-Zellen und CTLs beseitigen [20].

Außerdem konnte gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen den Metabolismus von aktivierten Immunzellen stören können und somit ebenfalls immunsuppressiv wirken. Dabei werden Signalmoleküle wie Adenosin oder cAMP genutzt, um Effektorzellen zu supprimieren [18]. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Treg-Zellen Apoptose induzieren, indem sie IL-2 und auch andere Zytokine aufbrauchen, die wichtige Überlebenssignale für Tconv-Zellen darstellen [21].

Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass Treg-Zellen in den Reifungsprozess von dendritischen Zellen eingreifen und deren Funktionalität beeinflussen [18]. Durch die konstitutive Expression von CTLA-4 auf der Oberfläche von Treg-Zellen können sie die Expression der B7-Moleküle auf DCs herunter regulieren [22]. Auf diese Weise wird dann die Aktivierung von Tconv-Zellen über APCs durch die Antigenpräsentation verhindert.

1.2 Sphingolipide

Ein wesentliches Element der Erkennung und Reaktion auf Pathogene durch das Immunsystem ist die Möglichkeit, Reize über Rezeptoren wahrnehmen und entsprechende Signale auslösen zu können. Dies wird durch die Plasmamembran, dem “flüssigen Mosaik“ aus unterschiedlichen Membranlipiden mit dazwischen enthaltenen Proteinen, ermöglicht.

Sphingolipide sind eine wichtige Klasse von Membranlipiden, die strukturell auf dem Molekül Sphingosin basieren. Zusammen mit den Glycerophospholipiden und Cholesterol bilden sie maßgeblich die Gesamtheit der Lipide zellulärer Membranen von Eukaryonten. Sie sind für die Struktur, die Membranfluidität und die Regulation verschiedener anderer Eigenschaften der Zelle von elementarer Bedeutung.

1.2.1 Der Sphingolipidstoffwechsel

Ein wichtiger Vertreter aus der Molekülklasse der Sphingolipide ist Sphingomyelin, das ubiquitär in menschlichen Zellen vorkommt und besonders in den Plasmamembranen von Nervenzellen in hoher Konzentration vorhanden ist. Mit Hilfe der Sphingomyelinasen entsteht aus Sphingomyelin Ceramid, ein weiteres Sphingolipid.

Ceramid wiederum kann durch weitere Enzyme zu Glucosylceramid, zu Sphingosin und Sphingosin-1-phosphat oder auch zu Ceramid-1-phosphat verstoffwechselt werden [23]. Wengleich anzunehmen ist, dass die Spaltung von Sphingomyelin in den meisten Zellen die Hauptquelle für Ceramid darstellt, besteht weiterhin auch die Möglichkeit, dass Ceramid über einen de-novo Pathway synthetisiert wird [24], [25]. Außerdem kann auch von der

Ceramidase, nach Umkehrung jener Reaktion, durch welche normalerweise Sphingosin entsteht, Ceramid gebildet werden [26].

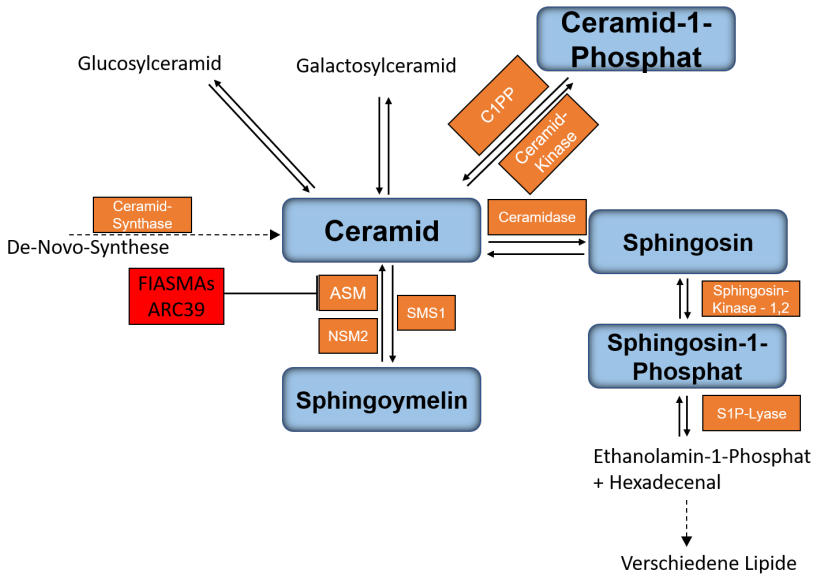


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Sphingolipidstoffwechsels. ASM: Saure Sphingomyelinase; NSM2: Neutrale Sphingomyelinase 2; SMS1: Saure Sphingomyelinase 1; C1PP: Ceramid-1-Phosphat-Phosphatase; S1P-Lyase: Sphingosin-1-Phosphat-Lyase; FIASMAs: Funktioneller Inhibitor der ASM.

All die verschiedenen Sphingolipide in diesem komplexen Stoffwechselnetzwerk (vgl. Abbildung 1.2) bestimmen wesentliche Zelleigenschaften und sind für viele Funktionen der Zelle von tragender Bedeutung.

1.2.2 Ceramid als ein bioaktives Lipid

Bei zahlreichen zellulären Stressreaktionen kommt es zur Akkumulation von Ceramid innerhalb der Zellmembran. Ursächlich hierfür ist, dass es durch Stimuli, wie Zytokine (TNF, β -nerve-growth-factor (=NGF)), Umwelteinflüsse (UV-Strahlung, Hypoxie, Hitze) oder verschiedene Chemotherapeutika und andere Moleküle zur Induktion vermehrter Generierung von Ceramid kommt. Dies geschieht durch eine Aktivierung von Sphingomyelinasen, aber auch durch vermehrte De-novo-Synthese, sowie durch Hemmung der weiteren Verstoffwechslung von Ceramid [27]. Auch in der Membran selbst kann Ceramid aus Sphingomyelin hergestellt werden, was weitreichenden

Einfluss auf die biologischen und physikalischen Eigenschaften der Zellmembran nimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass durch Ceramid auch das Verhalten der Zelle reguliert wird. Als second-messenger vermittelt es intrazelluläre Signale und setzt damit komplexe Mechanismen wie Apoptose, Zellzyklusarrest, Differenzierung und Zellalterung in Gang [28],[29].

Ceramide, wie auch andere Sphingolipide und Cholesterol, reichern sich in so genannten "lipid rafts" an. Dabei handelt es sich um Ansammlungen bestimmter Lipide innerhalb der Membran, die so eine Plattform für Rezeptoren und Enzyme bilden [30]. Insofern wird die Vorstellung des klassischen Flüssig-Mosaik-Modells erweitert, da sich Anhäufungen bestimmter Lipide in der Membran bilden. Eine solche Anhäufung treibt dann als Mikrodomäne, ähnlich einem Floß (engl. raft), innerhalb der Membran.

Daneben ist Ceramid auch in der Lage, stabile Poren in der äußeren Mitochondrienmembran aufzubauen, ein Mechanismus, der direkt oder indirekt Apoptose mitverursachen könnte [31]. Darüber hinaus werden wichtige Proteine und Enzyme in ihrer Funktion durch Ceramid reguliert. Hierzu zählen unter anderem die Aspartatprotease Cathepsin D [32], der Kinase Suppressor für Ras [33] und die Phospholipase A2 [34]. Auch die Proteinkinase C (PKC) wird durch Ceramid, aber auch durch Sphingosin gehemmt [35],[36],[37]. Dieses Enzym, welches in großem Umfang für die Signalweiterleitung innerhalb der Zelle verantwortlich ist, steuert unter anderem das Zellwachstum und hat auch für die Signaltransduktion in Immunzellen große Relevanz [38], [39].

Insgesamt ist Ceramid sowohl an der Zelloberfläche, als auch im Zellinneren an diversen zellbiologischen Mechanismen wie Apoptose, Mitogenese oder Immunregulation beteiligt [40]. Auch Sphingosin, Sphingosin-1-phosphat und Ceramid-1-phosphat besitzen als bioaktive Sphingolipide Bedeutung für die Vermittlung zellulärer Signale, wobei Ceramid im Zentrum des Stoffwechsels steht [23] (vgl. auch Abbildung 1.2).

1.2.3 Sphingomyelinasen

Die Regulation des komplexen Stoffwechselnetzwerks der Sphingolipide wird mithilfe zahlreicher Enzyme gewährleistet, welche die Umwandlungsreaktionen der Sphingolipidmoleküle ermöglichen (vgl. Abbildung 1.2). Durch die Steuerung dieser Enzyme wird so ein Gleichgewicht zwischen den funktionell verschiedenartigen Sphingosinderivaten aufrechterhalten und je nach Bedarf angepasst.

Eine zentrale Rolle besitzt die Enzymklasse der Sphingomyelinasen, durch welche die Spaltung von Sphingomyelin in Phosphorylcholin und Ceramid katalysiert wird. Anhand unterschiedlicher pH-Optima lassen sich die drei Enzyme alkalische, neutrale und saure Sphingomyelinase unterscheiden.

Die alkalische Sphingomyelinase

Die alkalische Sphingomyelinase wird in den Mucosazellen des unteren Gastrointestinaltrakts generiert. Sie scheint für die Verdauung von Sphingomyelin benötigt zu werden und wirkt durch die Generierung von Ceramid vermutlich protektiv gegenüber der Entstehung von Kolonkarzinomen und entzündlichen Darmerkrankungen [41]. Dieses Enzym, über welches insgesamt nur wenig bekannt ist, weißt keine strukturellen Ähnlichkeiten mit den anderen beiden Sphingomyelinasen auf und unterscheidet sich von diesen auch funktionell.

Die neutrale Sphingomyelinase

Die neutrale Sphingomyelinase(=NSM), bei welcher noch weiter zwischen einer Mg^{2+} -abhängigen und unabhängigen Form unterschieden werden kann, besitzt ihre optimale Wirkung bei einem pH-Wert von etwa 7 und ist in allen menschlichen Zellen vorhanden. Es ist anzunehmen, dass sie an der Bildung von durch Zellstress induziertem Ceramid mitverantwortlich ist [42]. Weiterhin scheint die NSM direkt innerhalb der Signalwege der Sphingolipide mitzuwirken und auch in zelluläre Prozesse wie der Apoptose involviert zu sein [24].

1.3 Die saure Sphingomyelinase

Die saure Sphingomyelinase (engl. acid sphingomyelinase=ASM) entfaltet ihre optimale Wirkung bei einem sauren pH-Wert von etwa 5 [43]. Zusammen mit der NSM ist sie für die Hydrolyse von Sphingomyelin innerhalb der Zelle verantwortlich und steht somit im Zentrum des Sphingolipidmetabolismus. Innerhalb der Enzymklasse der Sphingomyelinasen ist die ASM bisher am besten untersucht worden, da sie für die Medizin die größte Relevanz besitzt.

1.3.1 Lysosomale und sezernierte Form der ASM

Die ASM kommt in zwei unterschiedlichen Formen vor, da das Enzym entweder lysosomal lokalisiert ist, oder aber von der Zelle sezerniert wird. Beide Formen werden vom SMPD1-Gen codiert und entstehen durch unterschiedliche posttranslationale Modifikation eines gemeinsamen Vorläufer-Proteins [43], [44].

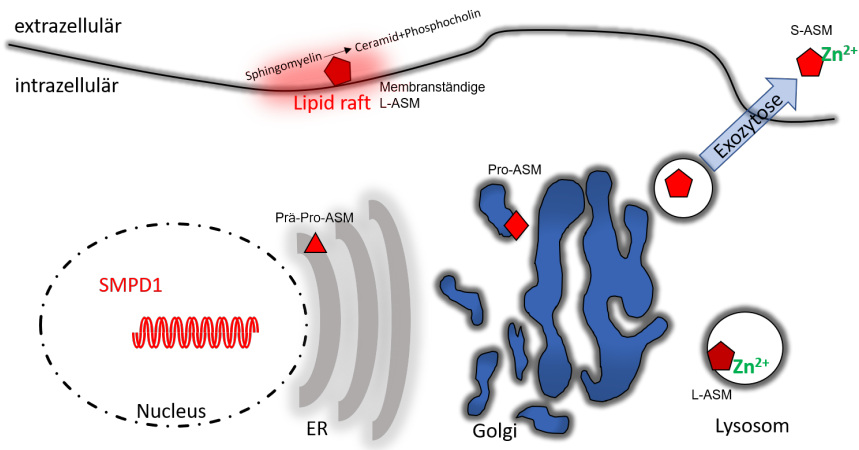


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Bildung von L-ASM (lysosomale Form) und S-ASM (sezernierte Form).

Durch die lysosomal lokalisierte ASM (L-ASM) wird ein wesentlicher Teil des Ceramids gebildet, das als Reaktion der Zelle auf verschiedene Stresssituationen, wie beispielsweise Strahlung, Chemotherapeutika oder Hypoxie gebildet wird. Indem die ASM zur Zelloberfläche gelangt, kann sie durch Generierung von Ceramid die Bildung von lipid rafts induzieren und somit eine Plattform für Rezeptoren und Enzyme aufbauen. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass über diesen Mechanismus auch der Fas-Rezeptor (=CD95), ein wichtiger Rezeptor zur Induktion von Apoptose, in der Membran angereichert wird [45].

Welche genaue Aufgabe die L-ASM besitzt, und worin exakt ihre Rolle innerhalb der lysosomalen Stoffwechselwege besteht, ist derzeit noch nicht abschließend geklärt. Weiterhin ist unklar, ob die Bildung von Ceramid innerhalb der Lysosomen hier auch ähnliche Signalfunktionen übernimmt wie an der Zelloberfläche [44].

Daneben existiert auch eine andere, sezernierte Form der ASM (S-ASM), die konstitutiv von der Zelle an die Umgebung abgegeben wird. Obwohl auch ihr pH-Optimum im Sauren liegt, ist sie in vivo ebenfalls in der Lage, Ceramid bei deutlich alkalischerem pH-Wert zu spalten. Während die L-ASM überwiegend durch mannosereiche Oligosaccharide glycosyliert ist, weißt die sezernierte Form, deren Wirkung von Zn²⁺ abhängig ist, komplexe Glykosylierungsmuster auf [44], [46].

Interessanterweise nimmt auch die L-ASM, nach ihrer Generierung im Golgi-Apparat und dem Transport zum Lysosom, Zn²⁺ auf, welches möglicherwei-

se für die funktionelle Tätigkeit des Enzyms nötig ist [44].

1.3.2 Bedeutung der ASM bei verschiedenen Krankheitsbildern

Mehr noch als neutrale und alkalische Sphingomyelinasen, ist gerade die ASM für die medizinische Forschung von besonderem Interesse. Bei vielen unterschiedlichen Erkrankungen kann eine Beteiligung am pathologischen Mechanismus oder aber eine Veränderung in der Aktivität dieses Enzyms festgestellt werden [47]. Welche genaue Bedeutung diese Veränderungen haben und inwieweit die saure Sphingomyelinase in der Pathogenese der einzelnen Erkrankungen eine Rolle spielt, ist jedoch meist noch ungeklärt.

Die weitreichende und vielfältige Bedeutung der ASM in der Medizin wird daher im Folgenden nur anhand einiger ausgewählter Beispiele angedeutet.

Niemann-Pick-Syndrom

Beim Niemann-Pick-Syndrom handelt es sich um eine seltene Erbkrankheit, welche weiter in die Subtypen A, B und C unterteilt werden kann. Während Typ C auf einem gestörten Transport von Cholesterol beruht, sind Typ A und B Folge eines genetischen Defekts im für die ASM codierenden SMPD1-Gen, wodurch ein fehlerhaftes Enzym mit verringerter Aktivität gebildet wird [43]. Dadurch kommt es zu einer intrazellulären Anhäufung von Sphingolipiden innerhalb der Lysosomen, da diese nicht mehr weiter verstoffwechselt werden können.

Die klinische Manifestation dieses Defekts kann sehr unterschiedlich ausfallen: schwere, neurodegenerative Verläufe mit schneller Progression sind beim Typ A typisch, während auch deutlich mildere Formen mit leichteren neurologischen Symptomen möglich sind. Als weitere Symptome können Hepatosplenomegalie, respiratorische Insuffizienz und kardiovaskuläre Komplikationen auftreten. Ursächlich für den individuell sehr unterschiedlichen Verlauf sind vermutlich nur geringe Unterschiede in der Restaktivität der ASM [43]. Zwar ist die Pathogenese der vielseitigen Symptome beim Niemann-Pick-Syndrom nicht vollständig geklärt, doch zeigt die Beteiligung mehrerer Organsysteme und der schwerwiegende Verlauf beim Typ A die weitreichende Bedeutung der sauren Sphingomyelinase in der Physiologie des menschlichen Körpers auf.

Arteriosklerose

Im Laufe des Lebens kann es zu Schäden in der Gefäßwand der Arterien kommen, welche nach langanhaltender Entzündungsreaktion und Einlagerung von Makrophagen, Lipiden und Proteinen zu einer Verengung des Gefäßlumens führen. Bricht ein solcher Plaque auf, kann sich darauf ein Thrombus bilden und das Gefäß wird verschlossen. Dieser Verlauf charakterisiert das Krankheitsbild der Arteriosklerose, deren Folgen zu den häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt zählen.

Es gibt Hinweise darauf, dass auch die ASM in die Pathogenese dieser komplex verursachten Krankheit involviert ist [44]. So geht beispielsweise eine erhöhte Sphingomyelinaseaktivität mit der Aggregation von low-density-lipoprotein (LDL) und der Vermehrung von Makrophagen (sogenannte Schaumzellen) in der Gefäßwand einher, was einen wesentlichen Schritt der Entstehung von Arteriosklerose darstellt [48], [49].

Die Generierung ceramidreicher Mikrodomänen auf der LDL-Oberfläche durch die S-ASM ermöglicht Interaktionen unter den Lipoproteinen und mit der Plasmamembran von Endothelzellen. Dies stellt möglicherweise die entscheidende Grundlage für die Anreicherung von Lipiden in der Arterienwand dar [50].

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die saure Sphingomyelinase an der Aktivierung von Thrombozyten und der Bildung fester Blutpfropfen beteiligt ist [51]. Während auch andere Mechanismen wie die Induktion von Autophagie und Apoptose durch die ASM eine Rolle spielen, sind genaue Rolle und Funktion des Enzyms in diesem Zusammenhang noch nicht vollständig verstanden (vgl. [48], [50]).

Diabetes mellitus

Häufig tritt die Arteriosklerose und deren Folgeerscheinungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder koronare Herzkrankheit im Rahmen eines metabolischen Syndroms, zusammen mit anderen Erkrankungen auf. Hierzu zählt unter anderem der Diabetes mellitus Typ II, bei dem die Patienten aufgrund einer Resistenz gegen Insulin erhöhte Blutglucosewerte aufweisen.

Bei diesen Patienten kann eine verstärkte Aktivität der S-ASM im Serum festgestellt werden, was auch eine mögliche Erklärung dafür bietet, dass Diabetiker häufiger an Arteriosklerose erkranken [52].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass erhöhte Mengen an Ceramid und anderen Sphingolipiden die Wirksamkeit von Insulin verschlechtern und so zur Entstehung einer Insulinresistenz im Sinne eines Diabetes mellitus Typ II beitragen [53]. Dabei werden durch die Sphingomyelinase und die

Generierung von Ceramid verschiedene Proteinkinasen in ihrer Aktivität beeinflusst, welche für die Phosphorylierung entscheidender Aminosäurestellen des Insulin-Rezeptor-Substrats (IRS-1) verantwortlich sind und so die Wirkung des Insulins bestimmen [54], [55].

Verschiedene Untersuchungen deuten weiterhin an, dass durch Ceramid neben der Entstehung einer Insulinresistenz auch die Apoptose von Beta-Zellen des Pankreas induziert und die Expression von Insulin inhibiert wird [56].

Tumorerkrankungen

Wie bereits erwähnt, ist die ASM in verschiedene Zellvorgänge wie Apoptose, Proliferation und Differenzierung eingebunden. Es ist daher nicht verwunderlich, dass sie auch beim unkontrollierten Zellwachstum in malignen Entartungen eine Rolle spielt.

Bemerkenswerterweise können verminderte Ceramidspiegel bei verschiedenen neoplastischen Erkrankungen wie Kolonkarzinomen [57] und Gliatumoren [58] festgestellt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im Mausmodell Lebermetastasen von Kolonkarzinomen durch die Wirkung der sauren Sphingomyelinase in ihrem Wachstum gehemmt werden [59].

Es ist anzunehmen, dass die Bildung bioaktiver Sphingolipide (v.a. Ceramid und Sphingosin-1-phosphat) bei Krebserkrankungen durch die Aktivität der ASM bestimmt wird. Durch Induktion von Apoptose und über komplexe Signalwege verhindern diese Lipide die Ausbreitung von Tumoren. Die saure Sphingomyelinase ist daher in gewisser Weise auch als Antionkogen anzusehen. Es ist somit auch nicht verwunderlich, dass die ASM zumindest bei einigen Krebsarten als Teil der malignen Entartung herunterreguliert ist (vgl. [47]).

Die zentrale Schnittstelle zur Tumورهemmung, welche durch die ASM kontrolliert wird, ist auch Angriffspunkt verschiedener Chemotherapeutika. Beispiele hierfür sind etwa Paclitaxel oder Cisplatin (vgl. [60] und [61]).

Für Ausbreitung und Behandlung einiger Krebsarten stellt die saure Sphingomyelinase also eine wichtige Komponente dar.

Neuropsychiatrische Erkrankungen

Neben dem bereits erwähnten Niemann-Pick-Syndrom, bei dem es zu schweren neurologischen Ausfallerscheinungen kommt, ist die ASM auch bei anderen Erkrankungen des zentralen Nervensystems von Relevanz [62].

Die Alzheimer-Krankheit ist im höheren Lebensalter die häufigste Form der Demenz. Bei dieser neurodegenerativen Veränderung des Gehirns kommt es zur Ablagerung des Tau-Proteins innerhalb der Zelle und zur Bildung

extrazellulärer Amyloid-Plaques [63]. Im Laufe der Erkrankung folgt ein zunehmender Untergang von Neuronen und eine Atrophie in bestimmten Hirnarealen, wodurch die Gedächtnisleistung und andere kognitive Fähigkeiten abnehmen [64].

Es konnte gezeigt werden, dass in den Gehirnen solcher Patienten die saure Sphingomyelinase vermehrt aktiv ist, was sich auch in einer Vermehrung von Ceramid zeigt [65]. Als Folge der verstärkten ASM-Aktivierung wird die zelluläre Autophagie gehemmt, über die normalerweise fehlerhafte Proteine im Zellinneren abgebaut werden [66]. Die saure Sphingomyelinase stellt daher eine wesentliche Komponente in der Pathologie von Alzheimer dar [67].

Auch bei vielen anderen neurologischen Krankheiten ist die ASM von Bedeutung: So haben beispielsweise genetische Untersuchungen gezeigt, dass bestimmte Mutationen im SMPD1-Gen mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Parkinson, einer weiteren Form von Demenz, einhergehen [68], [69]. Bei multipler Sklerose wiederum kann eine vermehrte Aktivität in reaktiven Astrozyten festgestellt werden [70].

Die Depression ist eine psychische Erkrankung, die durch Freud- und Antriebslosigkeit, sowie reduziertes Gefühlsempfinden gekennzeichnet ist. Wenngleich es sich um eine sehr häufige, chronische und schwere Krankheit mit einer Lebenszeitinzidenzrate von 10-20 % handelt, ist nur relativ wenig über die pathogenetischen Mechanismen bekannt [71].

Die gängige Theorie der Krankheitsentstehung besteht in der Hypothese, dass eine gestörte Wirkung der Neurotransmitter Serotonin und Noradrenalin für die Symptomatik verantwortlich ist (vgl.[71]). Dies ist auch ein Angriffspunkt vieler Antidepressiva, die zu einer Erhöhung der Transmittermenge im synaptischen Spalt führen.

Weiterhin zeigt sich bei einer Depression eine verringerte Neubildung von Nervenzellen im Bereich des Hippocampus [72].

Es gibt Hinweise darauf, dass erhöhtes Ceramid in diesem Hirnareal einen hemmenden Einfluss auf Bildung, Reifung und das Überleben von Neuronen hat und das emotionale Befinden beeinflussen kann [73]. Die saure Sphingomyelinase, welche das Ceramid synthetisiert, wird durch viele gängige Antidepressiva funktionell inhibiert [74]. Es ist denkbar, dass die Hemmung der ASM einen wesentlichen Mechanismus der antidepressiven Wirkung darstellt [75], [76].

Im Rahmen einer prospektiven Fall-Kontroll-Studie konnten in Blutproben von Patienten mit Depression höhere ASM-Aktivitäten als bei gesunden Kontrollen, sowie eine positive Korrelation zwischen Enzymtätigkeit und Schweregrad der Depression festgestellt werden [77].

All diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die saure Sphingomyelinase eine maßgebliche Komponente im Krankheitsgeschehen ganz unterschiedlicher neurologischer und psychischer Pathologien bildet, wobei genauere Mechanismen und Wechselwirkungen noch größtenteils unbekannt sind.

Infektionskrankheiten

Erkrankungen, die als Folge einer Infektion durch mikrobielle Organismen auftreten, bilden eine der bedeutendsten Krankheitsgruppen weltweit. Die bioaktiven Lipide Ceramid und Sphingosin besitzen auch hier im Zusammenhang mit ganz unterschiedlichen Erregern große Relevanz [78].

Beispielsweise induzieren Gonokokken in Epithelzellen und Fibroblasten die ASM und damit die Bildung von Ceramid [79]. Um humane Zellen infizieren zu können, ist es für diese Bakterien nötig, dass ceramidreiche Membrandomänen mit hohen Konzentrationen bestimmter Signal- und Rezeptormoleküle an der Zelloberfläche vorhanden sind.

Ähnliche Mechanismen konnten ebenfalls für die Infektion zerebraler Endothelzellen durch Meningokokken gezeigt werden [80]. Auch *Pseudomonas aeruginosa* verursacht eine verstärkte ASM-Aktivität und Bildung sphingolipidhaltiger "rafts", über die das Bakterium in die Zelle eindringt, wobei diese Membranplattformen hier auch für eine adäquate Immunantwort mit Induktion von Apoptose und Freisetzung von Zytokinen erforderlich sind [81].

Noch zahlreiche weitere Bakterien wie *Escherichia coli* [82], *Campylobacter jejuni* [83] und Mykobakterien [84], aber auch Viren wie Masern- [85], Influenza- [86], Rhino- [87] oder Sindbisviren [88], sowie Plasmodien [89] und Prionen [90] nutzen derartige oder zumindest ähnliche Membrandomänen im Rahmen einer Infektion.

In der westlichen Welt sind zunehmend nosokomiale Infektionen von Bedeutung. Insbesondere multiresistente Erreger wie Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) bereiten im Gesundheitssystem große Probleme. Untersuchungen im Mausmodell haben ergeben, dass *S. aureus* eine Aktivierung des ASM/Ceramid-Systems induziert und dadurch zur Entstehung eines Lungenödems führt. Sowohl genetische als auch pharmakologische Inhibition der ASM unterbinden diesen Mechanismus und schützen gleichzeitig vor einer lebensbedrohlichen Sepsis [91].

Weiterhin nutzen auch verschiedene Viren den Sphingolipidstoffwechsel durch gezielte Einflussnahme aus (vgl. [92]). Infektionen mit Masern führen über das Protein DC-SIGN zur Aktivierung von Sphingomyelinasen. Hierdurch kommt es zur Bildung von lipid rafts und zur Akkumulation von CD150, einem Aufnahmerezeptor für Masern, wodurch das Virus vermehrt dendritische Zellen infizieren kann [93]. Auf noch unvollständig verstandene Weise interagiert das Virus mit den dendritischen Zellen und T-Zellen, wodurch

das Immunsystem gehemmt wird, während die Infektion verstärkt wird [94]. Daneben benötigen auch Rhino- und Ebolaviren zum erfolgreichen Eindringen ins Zellinnere eine funktionsfähige ASM [87], [95].

Weitere Krankheiten

Infektionen durch mikrobielle Krankheitserreger spielen auch beim Krankheitsbild der zystischen Fibrose eine besondere Rolle. Vor allem *Pseudomonas aeruginosa* kann hier Pneumonien auslösen, was eine schwerwiegende und mitunter lebensbedrohliche Komplikation darstellt. Entzündungsreaktionen und Suszeptibilität der Lunge durch *Pseudomonas aeruginosa* werden bei der zystischen Fibrose durch die Anreicherung von Ceramid über die ASM vermittelt. Untersuchungen in Mäusen zeigten auch, dass eine pharmakologische Hemmung der sauren Sphingomyelinase die Beschwerden lindern und eine Infektion verhindern kann [96].

Des Weiteren lassen sich Veränderungen und Auffälligkeiten im Sphingolipidmetabolismus und in der ASM-Aktivität bei einigen Lebererkrankungen feststellen. So können sowohl bei Patienten mit chronischer Hepatitis C, als auch bei Patienten mit nicht alkoholischer Steatohepatitis (NASH) erhöhte ASM-Spiegel im Blut gemessen werden [97].

Gleiches gilt auch für Morbus Wilson, eine genetische Kupferspeicherkrankheit der Leber, bei der das Kupfer ASM-abhängig zum Anstieg von Ceramid und darüber zur Apoptose von Hepatozyten führt [98].

Insgesamt ist die saure Sphingomyelinase im Krankheitsgeschehen ganz unterschiedlicher Pathologien beteiligt. Ihre Bedeutung für all diese Krankheiten wurde lange Zeit nicht erkannt und ist noch lange nicht voll verstanden. Insbesondere betrifft dies aber die Mechanismen, durch welche die ASM eine solch zentrale Rolle einnimmt. Zu beachten ist, dass es bei vielen der genannten Beispiele auch zu einer Beeinträchtigung bzw. Mitbeteiligung des Immunsystems kommt, weswegen Untersuchungen zur Einflussnahme der ASM auf Immunzellen ein besonderes Interesse zukommt.

1.3.3 Pharmakologische Hemmung

In Anbetracht dessen, dass die saure Sphingomyelinase im Krankheitsgeschehen ganz unterschiedlicher Pathologien hoch relevant ist, sind somit auch Möglichkeiten zur pharmakologischen Inhibition der ASM für die medizinische Forschung von großem Interesse.

Funktionelle Inhibitoren der ASM

Die in experimentellen Fragestellungen wohl am häufigsten verwendete Klasse an Hemmstoffen der ASM ist die der funktionellen Inhibitoren der ASM (sog. FIASMAs). Bei diesen Substanzen handelt es sich um schwach-basische, lipophile Moleküle. Durch Diffusion gelangen sie ins Innere von Lysosomen und erhalten in dem sauren Milieu durch Aufnahme von Protonen eine positive Ladung. Da die protonierte Form jedoch nicht mehr problemlos die Membran überqueren kann, kommt es so zur Anreicherung dieser Substanzen im Inneren des Lysosoms.

Die positiv geladenen Moleküle konkurrieren anschließend mit der ASM, welche ebenfalls kationisch geladen ist, und an der Membraninnenseite an negativ geladenen Lipide bindet. In Folge dessen verdrängen die FIASMAs die saure Sphingomyelinase und es kommt zur Ablösung des Enzyms von der Membran [99],[100], [101] (vgl. auch Abbildung 1.4).

Daraufhin wird die saure Sphingomyelinase durch proteolytische Prozesse abgebaut [102]. Es handelt sich daher nur um einen "funktionellen" Inhibitionsmechanismus, da das Enzym selbst nicht direkt gehemmt wird.

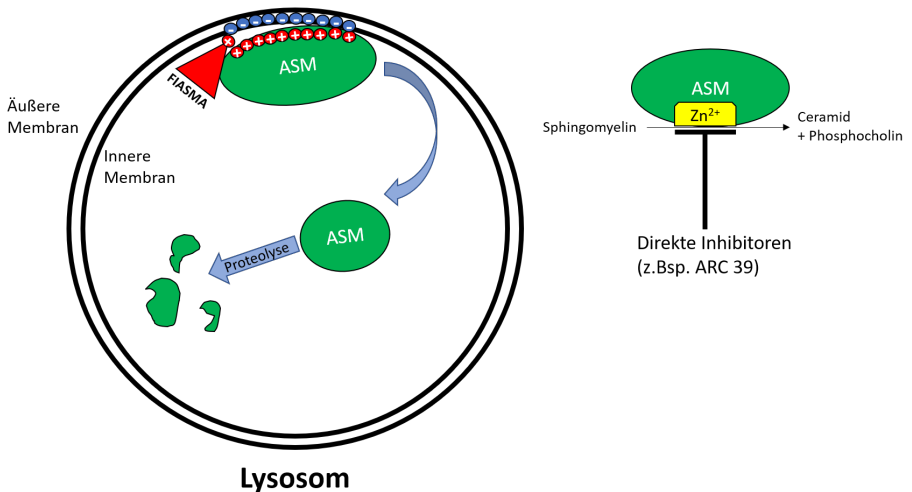


Abb. 1.4: Schematische Darstellung zur ASM-Inhibition.

Die Klasse der FIASMAs enthält ganz unterschiedliche Pharmaka aus sehr verschiedenen Substanzklassen, darunter viele therapeutisch eingesetzte Arzneimittel gegen psychische, neurologische, gastrointestinale oder auch kardiologische Beschwerden [100].

Wie bereits erwähnt, sind auch viele Antidepressiva in der Lage, die saure Sphingomyelinase auf diese Weise zu inhibieren. Vor allem Amitriptylin,

Desipramin und Imipramin wurden bereits in vielen experimentellen Untersuchungen als potente Hemmstoffe der ASM eingesetzt.

Da die Wirkungsweise der Inhibition jedoch nicht spezifisch für die saure Sphingomyelinase ist, bleibt anzunehmen, dass der hemmende Effekt noch viele andere lysosomale Proteine und Enzyme betrifft. So zeigt sich, dass auch die saure Ceramidase durch Desipramin inhibiert wird [103].

Direkte Inhibitoren der ASM

Es gibt insgesamt nur wenige Substanzen, die über einen direkten Mechanismus die saure Sphingomyelinase hemmen. Neben einzelnen Substratanaloga, die jedoch nur mäßig in der Lage sind, das Enzym kompetitiv zu hemmen, gibt es noch eine Gruppe phosphathaltiger Inhibitoren [104].

Hierzu zählen auch einige Moleküle aus der Arzneimittelklasse der Bisphosphonate, die vor allem bei der Osteoporosebehandlung verschrieben werden, und mitunter sehr potent die ASM hemmen [105]. Durch Komplexbildung mit dem Zn^{2+} -Molekül im katalytischen Zentrum der sauren Sphingomyelinase blockieren diese Substanzen direkt das Enzym (vgl. auch schematische Abbildung 1.4).

Darüber hinaus existieren noch einige Xanthone und andere, natürlich vorkommende Moleküle, die jedoch überwiegend nur schwach inhibitorisch wirken und teilweise auch nur eingeschränkt selektiv für die ASM sind [106], [104].

Therapeutische Möglichkeiten

Es stellt sich die Frage, ob sich eine pharmakologische Inhibition der sauren Sphingomyelinase auch klinisch anwenden lässt. Wie erwähnt, schützt die pharmakologische Hemmung der ASM im Mausmodell vor einem Lungenödem und der Entstehung einer Staphylokokkensepsis [91], sowie bei der zystischen Fibrose vor einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* [96]. Bei der Behandlung von Depressionen stellt sie möglicherweise sogar einen wesentlichen Wirkmechanismus der medikamentösen Therapie dar [75], [76].

Auch bei Arteriosklerose etwa könnte eine pharmakologische Hemmung der ASM eingesetzt werden, da die LDL-Bildung und die Entstehung von Gefäßwandplaques durch die Enzymaktivität mitverursacht werden [48], [50]. Weiterhin wurde gezeigt, dass der Einsatz der FIASMAs Amitriptylin und Fluoxetin die Bildung von Thromben hemmt, was den entscheidenden Mechanismus beim Schlaganfall darstellt [51]. Daneben konnte im Mausmodell auch eine Besserung der Lebererkrankungen NASH, Leberfibrose und Morbus Wilson durch Einsatz von Amitriptylin erreicht werden [98],[107].

Trizyklische Antidepressiva, von denen viele FIASMAs sind, werden seit Jahrzehnten klinische eingesetzt, sodass bereits große Erfahrung im Ein-

satz dieser Substanzen vorhanden ist. Gleichzeitig weisen diese Medikamente auch nur wenige unangenehme Nebenwirkungen auf und werden von Patienten im Allgemeinen gut vertragen. Diese Arzneimittel wären daher geeignete Kandidaten, um als ASM-Inhibitoren auch bei vielen anderen Krankheitsbildern eingesetzt zu werden [101].

Gleichzeitig ist jedoch auch Vorsicht geboten, zumal die ASM durch die Bildung von Ceramid auch für wichtige zelluläre Reaktionen benötigt wird und eine vollständige ASM-Blockade in der fatalen Symptomatik des Niemann-Pick-Syndroms resultieren würde.

1.4 Bioaktive Lipide und ASM in T-Zellen

Zumal die saure Sphingomyelinase derart umfassend in viele komplexe Signalwege eingebunden ist und bei ganz unterschiedlichen Krankheiten Bedeutung findet, ist es nicht verwunderlich, dass sie auch auf das Immunsystem und die T-Zellen Einfluss nimmt. Dass eine voll funktionsfähige Immunantwort von der ASM abhängig ist, zeigt sich beispielsweise daran, dass es bei Patienten mit Niemann-Pick-Syndrom vermehrt zu schweren Infektionen der Lunge kommt [108].

Im Folgenden soll insbesondere auf Aktivierung und Funktion von CD4⁺ T-Zellen und die Bedeutung der ASM bei diesen Vorgängen eingegangen werden.

1.4.1 Signalwege der T-Zell-Aktivierung

Die Signaltransduktion durch TCR/CD3 sowie durch den kostimulatorischen Rezeptor CD28 oder aber durch Zytokine bilden das Fundament, auf dem T-Zell-Reaktionen basieren und sind für Zellfunktion und -differenzierung maßgebend. Die nachgeschalteten Signalwege bilden ein komplexes Netzwerk aus messenger-Molekülen, Enzymen, Kanälen und Transkriptionsfaktoren.

Ein zentraler Signalweg besteht in der Aktivierung der Phospholipase C γ durch CD3 und daran assoziierte Tyrosinkinase, wodurch es zur Bildung der second-messenger-Moleküle Diacylglycerol(DAG) und Inositoltrisphosphat(IP3) kommt. DAG und IP3 führen durch Bindung an Rezeptoren zum Einstrom von Ca²⁺ aus dem ER und dem Extrazellulärraum, sowie zur Aktivierung der Proteinkinase C. Durch Phosphorylierung reguliert die PKC verschiedene Signalproteine, Enzyme und Transkriptionsfaktoren.

Das Ca²⁺ ist durch Bindung an Calmodulin in der Lage, Calcineurin und andere Proteine zu aktivieren, wodurch ebenfalls die Proteinexpression verändert und die T-Zelle aktiviert wird [109],[110].

Ein weiterer Signalweg wird in der Aktivierung von Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPK) ausgelöst. Diese Enzyme bilden eine Kaskade von hintereinander geschalteten Proteinkinasen, die fortlaufend jeweils nachfolgende Kinasen phosphorylieren und somit wiederum aktivieren. Dadurch wird ein zelluläres Signal nicht nur weitergeleitet, sondern auch angepasst und amplifiziert.

Hinter einer T-Zell-Aktivierung nach Antigenpräsentation steht somit ein komplexes Geflecht miteinander verbundener Signalwege aus Messenger-Molekülen, Kanälen und Enzymen. Das Resultat dieses Prozesses ist unter anderem eine Aktivierung maßgebender Transkriptionsfaktoren wie dem nuclear factor of activated T cells (NFAT), dem nuclear factor ' κ -light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) oder dem Aktivator-Protein-1 (AP-1). Daneben treten innerhalb kürzester Zeit auch Veränderungen der zytoskelettalen Struktur auf, wodurch die Lokalisation von Oberflächenrezeptoren angepasst wird und die T-Zell-Stimulation noch verstärkt werden kann [111]. Durch die Zellaktivierung werden letztlich Proliferation und Differenzierung stimuliert und die Aktivierungsmarker CD25 und CD69 sowie IL-2 verstärkt exprimiert [112].

1.4.2 Molekulare Angriffspunkte der Sphingolipide

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass das TCR-Signal an verschiedenen Stellen durch bioaktive Sphingolipide und somit auch durch die ASM beeinflusst wird.

Generell ist die passende Lokalisation und Organisation der Rezeptoren in der Membran für die T-Zell-Aktivierung notwendig. Dies wird durch ceramidreiche lipid rafts ermöglicht, die gleichzeitig verschiedene Bestandteile des Signalwegs, sowie auch die Interaktionen zwischen Proteinen und Kinasen in ihrer Funktion und Dynamik regulieren [112], [113].

Wie bereits erwähnt, werden auch verschiedene Signalproteine, wie der Kinase Suppressor für Ras [33] oder die PKC [35], [36], [37] durch Ceramid bzw. Sphingosin in ihrer Funktion gehemmt.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die ASM nach Aktivierung des TNF-Rezeptors Ca^{2+} -Kanäle blockiert, die für die Auslösung des Ca^{2+} -Signals benötigt werden [114]. Auch nach Stimulation mit TNF bzw. CD95 kommt es zur ASM-abhängigen Bildung von Ceramid und nachfolgend Sphingosin, wodurch die Ca^{2+} -Kanäle gehemmt werden [109], [115], [116].

Demgegenüber wird CD95, als ein wichtiger Rezeptor für die Selbsttoleranz, durch die ASM in der Zellmembran angereichert und kann dadurch Apoptose in T-Zellen auslösen [45].

Neuere Nachforschungen haben ergeben, dass die ASM bei Stimulation humaner CD4^+ T-Zellen durch anti-CD3/CD28-Antikörper wesentliche Aktivierungswege und Proliferationssignale vermittelt, zumal entsprechende Ef-

fekte nach pharmakologischer Inhibition der ASM ausblieben [117], [118]. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die ASM sowohl im CD3-, als auch im CD28-Signalweg zentrale Wirkungen vermittelt und damit unmittelbar die Aktivierung von T-Zellen steuert. Darüber hinaus werden vermutlich auch reguläre T-Zell-Reaktionen und T-Zell-Differenzierung von ihr reguliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Sphingolipide an vielen verschiedenen Stellen des komplex-organisierten Signalgeflechts von T-Zellen angreifen. Bei der Signaltransduktion durch die MAPK-Kaskaden oder durch das Ca^{2+} handelt es sich generell um sehr allgemeine Mechanismen, die in vielerlei Zelltypen Anwendung finden und keinesfalls exklusiv auf T-Zellen beschränkt sind. Möglicherweise ist dies auch ein Grund dafür, dass die ASM bei zahlreichen Krankheiten mit ganz unterschiedlichen Ätiologien involviert ist.

1.4.3 Effekte der ASM auf T-Zellen

Da die Sphingolipide derart vielfältig in die Signaltransduktion von T-Zellen eingreifen, stellt sich die Frage, welche funktionellen Auswirkungen dieses auf die T-Zelle hat und welche Folgen sich aus einer veränderten ASM-Aktivität ergeben.

Obwohl die Forschungsarbeit in diesem Bereich noch am Anfang steht, konnten bereits einige Auswirkungen veränderter Sphingolipidspiegel auf die verschiedenen Subpopulationen von CD4^+ T-Zellen beobachtet werden [119].

Bedeutung für konventionelle T-Zellen

In-vitro-Untersuchungen mit ASM-Knock-out-Mäusen haben ergeben, dass die saure Sphingomyelinase für eine funktionsfähige Sekretion von IL-2 aus CD4^+ TH-Zellen benötigt wird, während die Signaltransduktion durch CD28 zumindest in diesem Aufbau unabhängig von der ASM zu funktionieren scheint [120]. Es konnte weiter gezeigt werden, dass Gedächtnis-T-Zellen von ASM-Knock-out-Mäusen durch einen IL-2-Mangel anfällig für Glucocorticoid-induzierten Zelltod sind, sodass der ASM, anders als bisher beschrieben, auch eine zellprotektive Rolle zukommt [121].

Weiterhin fraglich ist, inwieweit die ASM für die Differenzierung von Bedeutung ist, da die T-Zell-Subpopulationen von Knock-out-Mäuse in diesen Untersuchungen ähnlich verteilt waren wie Zellen von Wildtyp-Mäusen. Bei Patienten mit Morbus Crohn wurde jedoch gezeigt, dass die ASM in den STAT3/mTOR-Signalweg eingebunden ist und dadurch für die Differenzierung von TH17-Zellen benötigt wird [122].

Da T-Zellen ihre Funktion durch die Kommunikation mit anderen Zellen

wahrnehmen, ist auch die Beobachtung interessant, dass die saure Sphingomyelinase in Endothelzellen die Transmigration von T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke reguliert [123]. Vermutlich spielt dies bei der Entstehung von multipler Sklerose eine Rolle.

Bedeutung für regulatorische T-Zellen

Auch regulatorische T-Zellen werden entscheidend durch die saure Sphingomyelinase moduliert. In Experimenten mit ASM-Knock-out-Mäusen hat sich gezeigt, dass in diesen Tieren vermehrt Treg-Zellen vorhanden sind und, dass die ASM durch Bildung von Ceramid die Vermehrung von regulatorischen T-Zellen inhibiert [124], [125], (vgl. auch [126]). Dass dies auch direkt funktionelle Auswirkungen hat, zeigt sich daran, dass die ASM-defizienten Mäuse durch verstärkte immunsuppressive Wirkung der Treg-Zellen einen schlechteren Verlauf nach einer Infektion mit Masernviren aufweisen [125]. Eine Vermehrung von regulatorischen T-Zellen in der Wildtypmaus lässt sich auch durch den Einsatz von FIASMA erreichen, sodass es zu einer Annäherung an den Phänotyp der ASM-Knock-out-Mäuse kommt. Die externe Zugabe von C6-Ceramid zu Zellkulturen geht hingegen mit einer Verringerung der Treg-Zellfrequenzen einher.

Noch ungeklärt ist, ob ein Anstieg der Treg-Zellen und eine verstärkte Suppression des Immunsystems in Folge einer ASM-Inhibition auch im humanen System erreicht werden kann.

Bemerkenswerterweise wurden eine Vermehrung von regulatorischen T-Zellen, sowie eine Unterdrückung von konventionellen T-Zellen in Form von gehemmter Proliferation und verminderter Sekretion proinflammatorischer Zytokine bereits bei Patienten beobachtet, die unter einer Therapie mit Antidepressiva standen [127]. Diese Arzneimittelklasse, zu der zahlreiche potente FIASMA zählen, könnte daher in Zukunft auch zur immunsuppressiven Therapie eingesetzt werden [128].

Noch unaufgeklärt ist, ob die Hemmung der sauren Sphingomyelinase tatsächlich einen bedeutenden Wirkmechanismus dieses Effekts ausmacht, da beispielsweise auch eine Immunsuppression in Folge eines veränderten Serotonintransports denkbar ist.

1.5 Sertralin und Citalopram

Um zu untersuchen, welche Auswirkung eine pharmakologische Inhibition der sauren Sphingomyelinase auf die Zellen des adaptiven Immunsystems hat, wurden zur Enzymhemmung die beiden Antidepressiva Sertralin und Citalopram verwendet.

Dabei handelt es sich um selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer(SSRI),

die im klinischen Alltag weitläufig zur Behandlung von Depressionen, Manien oder Angststörungen eingesetzt werden. Beide Medikamente sind FI-ASMAs und verdrängen die ASM von der inneren lysosomalen Membran, wodurch diese funktionell inhibiert wird.

Während Sertralin als ein starker Hemmstoff der ASM angesehen werden kann, weist Citalopram nur schwache inhibitorische Wirkung auf [100]. Aufgrund dieser Eigenschaften sind Sertralin und Citalopram geeignete Substanzen um die Rolle der ASM in Immunzellen zu untersuchen.

1.6 Ziele der Arbeit

Die saure Sphingomyelinase ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das durch die Spaltung von Sphingomyelin zu Ceramid weitreichend in fundamentale, zelluläre Mechanismen eingreift und an Vorgängen vieler verschiedener Krankheiten beteiligt ist. Besondere Bedeutung kommt der ASM auch im adaptiven Immunsystem und im Verhalten von konventionellen und regulatorischen T-Zellen zu.

Untersuchungen im Mausmodell legen nahe, dass eine Hemmung der sauren Sphingomyelinase durch Vermehrung von regulatorischen T-Zellen genutzt werden könnte, um das Immunsystem zu supprimieren. Derzeit ungewiss ist, ob und in welcher Weise dieser Mechanismus auch beim Menschen angewandt werden kann.

Unter Einsatz verschiedener Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase wurde daher untersucht, welche Auswirkungen eine Hemmung der ASM auf humane Tconv- und Treg-Zellen hat.

Dabei wurden In-Vitro-Experimente durchgeführt, um die Effekte unterschiedlicher Enzymaktivität auf Proliferation, Zytokinproduktion und Expression zellulärer Marker zu ermitteln.

2. Material und Methoden

Alle durchgeführten Experimente wurden im Zeitraum von Februar bis Oktober 2016 am Institut für Virologie und Immunbiologie in Würzburg durchgeführt.

2.1 Verwendetes Material

Mäuse

Bei den verwendeten Mäusen handelt es sich um C57BL/6 (J-Stamm) Wildtyp-Mäuse, die unter keimfreien Bedingungen in Eigenzucht im Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg entstanden sind. Die Tiere wurden ursprünglich 1921 von C. C. Little gezüchtet.

Humane Blutproben

Die Blutproben für die Ficoll-Dichtezentrifugation und Gewinnung von PBM-Cs wurden durch das Universitätsklinikum Würzburg aus nicht verwendetem Blut von Thrombozytenspendern bereitgestellt.

Medium, Lösungen und Puffer

Medium

Standardmedium für humane Zellen:

RPMI-Medium 1640 Medium (Gibco) mit 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, nicht essentielle Aminosäuren 1:100 (100x MEM), 1 mM Natriumpyruvat, 10nM HEPES, 50 μM 2-Mercaptoethanol

Leukozytenseparationsmedium Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich)

Medium für Mauszellen:

RPMI-Medium 1640 Medium (Gibco) mit 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin und 5% FCS

Puffer

FACS-Puffer:

PBS mit 0,1% BSA und 250 mg/l Natriumazid

Fixations-/Permeabilisierungspuffer:

1/4 Fixations-/Permeabilisierungskonzentrat (eBioscience)

3/4 Fixations-/Permeabilisierungsdiluent (eBioscience)

Permeabilisierungspuffer:

Permeabilisierungspuffer 10X (eBioscience) 1:10 in destilliertem H_2O

ASM-Substrat-Puffer:

0,1 mM Natriumacetat, 1,3 mM EDTA, 0,2% Natrium-Taurocholat, mit 20%-iger Essigsäure eingestellt auf $\text{pH}=5,2$

Lösungen

HMU-PC:

1,35 mM HMU-PC (6-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl-phosphorylcholin) (Moscerdam) in ASM-Substrat-Puffer, gelagert bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$

Stopplösung:

0,2 M Glycin, 0,2 M NaOH, 0,25% Triton X; $\text{pH}=11,0$

BSS (balanced salt solution):

BSS I: 50 g Glucose, 11,9 g Na_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 , 0,5 g Phenolrot in 5 l destilliertem H_2O

BSS II: 320 g NaCl, 20 g KCl, 10 g MgCl_2 , 10 g MgSO_4 , 9,25 g CaCl_2 in 5 l destilliertem H_2O

125 ml BSS I mit 125 ml BSS II mischen mit 750 ml destilliertem H_2O

BSS/BSA:

BSS mit 0,2% BSA (Bovines Serumalbumin)

Trypanblau:

0,04% Trypanblau in PBS

PBS:

138mM NaCl, 2,7mM KCl, 6,5mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, 0,9mM CaCl₂, 0,5mM MgCl₂, pH=7,4 (aus der Medienküche des Instituts für Virologie und Immunbiologie Würzburg)

Penicillin/Streptomycin:

jeweils 1g/10ml (aus der Medienküche des Instituts für Virologie und Immunbiologie Würzburg)

humane Antikörper

αCD4-PerCP 1:50 eingesetzt (Biolegend)
αCD69-FITC 1:100 eingesetzt (Biolegend)
αCD25-PE 1:50 eingesetzt (BD Biosciences)
αCD25-APC 1:50 eingesetzt (Biolegend)
αCD45RA-PE 1:100 eingesetzt (Biolegend)
αFoxP3-APC 1:50 eingesetzt (Biolegend)
αCTLA4-PECy7 1:50 eingesetzt (Biolegend)
αCD3 (HIT3a) (BioLegend, Cat.: 300314)
αCD28 (CD28.2) (BioLegend, Cat.: 302923)

murine Antikörper

αCD4 Brilliant Violet 421 1:1000 eingesetzt (Biolegend)
αCD25-PE 1:300 eingesetzt (Biolegend)
αFoxp3-PerCP 1:300 eingesetzt (Miltenyi Biotec)
αCTLA4-PECy7 1:300 eingesetzt (Biolegend)

Biochemische Reagenzien

Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) (Life Technologies Cat.: V12883)
Diphtherie-Tetanus-Kombinationsimpfstoff (Td-RIX) (GlaxoSmithKline)
Fetales Kälberserum (FCS)
Fixable Viability Dye eFluor 780 1:1000 eingesetzt (eBioscience Cat.: 65-0865-18)
Normal Maus IgG (nmIg) 1:50 eingesetzt (Sigma Aldrich, Cat.: 12-371)
Proleukin (IL-2) (Novartis Pharma, Cat.: 02238131)
Tuberkulin PPD RT23 SSI (Pharmore, Cat.: 302956)
Sertralin-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich)
Citalopram-Hydrobromid (Sigma-Aldrich)
C6-Ceramid (Avanti Polar Lipids)

C16-Ceramid (Avanti Polar Lipids)
nicht essentielle Aminosäuren 1:100 (100x MEM) (Gibco)
1 mM Natriumpyruvat (Gibco)
10nM Hepes (Gibco)
50 μ M 2-Mercaptoethanol (Gibco)
Der ASM-Inhibitor ARC39 wurde freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr.
rer. nat. Christoph Arenz zu Verfügung gestellt.

Reagenzsätze

LEGENDplex Multi-Analyte Flow Assay Kit (BioLegend)

Human IL-5 Capture Beads A4 (Cat.: 740043)
Human IL-2 Capture Beads A6 (Cat.: 740041)
Human IL-140 Capture Beads A10 (Cat.: 740046)
Human IFN- γ Capture Beads B2 (Cat.: 740052)
Human IL-17A Capture Beads B4 (Cat.: 740048)
Human IL-4 Capture Beads B6 (Cat.: 740042)
Human Th Cytokine Panel Standard (Cat.: 740397)
Human Th Cytokine Panel Detection Antibodies (Cat.: 740071)
Buffer Set (10 Komponenten) (Cat.: 740075)

MagniSort Human CD4 T cell Enrichment Kit (affymetrix, eBioscience)

Cat.: 8804-6811-74
MagniSort Human CD4 T cell Enrichment Antibody Cocktail (Cat.: MS22-7793)
MagniSort Negative Selection Beads B (Cat.: NB-6001)
Magnet: MagniSort Magnet, 5 mL (Cat.: MAG-4902)

CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-} Reg. T Cell Isolation Kit II human (Miltenyi Biotec)

Order no.: 130-094-775

CD4⁺CD25⁺ CD127^{dim/-} T Cell Biotin-AB Cocktail II, human
Anti-Biotin MicroBeads
CD25 MicroBeads II, human

Säulen:

LD Columns (Cat.: 130-042-901)
LS Columns (Cat.: 130-042-401)
Magnet: Midi MACS Separator (Cat.:130-042-302)

Verbrauchsmaterial

15ml-Röhrchen (Greiner Bio-One) 50ml-Röhrchen (Greiner Bio-One) FACS-Röhrchen (Sarstedt)
Eppendorfgefäße 1,0 ml (Sarstedt)
Eppendorfgefäße 1,5 ml (Sarstedt)
Eppendorfgefäße 2,0 ml (Greiner Bio-One)
Handschuhe SensiCare Ice Blue Nitrile Exam Gloves (Medline Industries)
Leucosep-Röhrchen (Greiner Bio-One)
Mikrotiter-Platte (24 Napf) Flachboden (Greiner Bio-One) Mikrotiter-Platte (96 Napf) Rundboden (Greiner Bio-One) Mikrotiter-Platte (96 Napf) schwarz für Fluoreszenzmessung (Sigma-Aldrich)
Mikrotiter-Platte (96 Napf) V-Boden (A. Hartenstein)
Pasteurpipetten 5 ml (Greiner Bio-One)
Pasteurpipetten 10 ml (Greiner Bio-One)
Pipettenspitzen 10 μ l (Sarstedt)
Pipettenspitzen 200 μ l (Greiner Bio-One)
Pipettenspitzen 1000 μ l (Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH)
Zellkulturplatte (96 Napf) U-Boden (Greiner Bio-One)
Zellsieb 70 μ m und Stempel (Sigma-Aldrich)

Chemikalien

2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)
ddH₂O (aus eigener Laboranlage)
Glycin (AppliChem)
Natriumazid (AppliChem)
Natriumacetat (AppliChem)
EDTA (AppliChem)
Natrium-Taurocholat (Sigma-Aldrich)
Essigsäure (A. Hartenstein)
Methanol (A.Hartenstein) Terralin (Schülke) Trypanblau (AppliChem)
Triton X-100 (Sigma-Aldrich)

Computersoftware

FACSDiva Software v.6.1.3 (BD Bioscience)
FlowJo v.7.6.5 (FlowJo, LLC)
LEGENDplex Data Analysis Software v.7.0 (Biolegend)
Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation)
Microsoft PowerPoint 2016 (Microsoft Corporation)
OriginPro 2016G (Origin Lab)

Geräte

Autoklav/Dampfsterilisator (Melag)
Computer Lenovo idealpad 300 (Lenovo)
Deckgläser (A. Hartenstein)
Durchflusszytometer LSR II (BD Bioscience)
Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton Dickinson)
Eismaschine AF 100 (Scotsmann)
Kühlschrank 4 °C mit Gefrierschrank -20 °C (SikaFrost Comfort Electronic)
FACS-Sorter BD FACSAria III cell sorter (BD Bioscience)
Fluoreszenzmessgerät SAFIRE II (Tecan)
Gefrierschrank -80 °C Forma 900 Series (Thermo Scientific)
Inkubationsschrank Heracell 240i (Thermo Fisher Scientific)
Mehrkanalpipette Discovery+ (HTL)
Mikroskop Leica DMIL (Leica Microsystems)
Pipetten (Eppendorf)
Sezierbesteck (A. Hartenstein)
Sterilbank Gelaire BSB 4A (Gelaire)
Tischzentrifuge Millifuge (Merck Millipore)
Ultraschallbad Type 07 (Electrosonic GmbH)
Vortexer Genie 2 (Scientific Industrie)
Wasserbad (A. Hartenstein)
Zählkammer Neubauer (LO-Laboroptik)
Zentrifuge Rotanta 460 R (Hettich)

2.2 Angewandte Methoden

Sektion der Mäuse

Für die Gewinnung von Mauszellen wurden die Mäuse durch Kohlenstoffdioxidintoxikation getötet und anschließend in Rückenlage fixiert. Danach wurde die Bauchhöhle entlang der Medianlinie eröffnet und zur besseren Darstellung der inneren Organe wurden Schnitte in Richtung der unteren Extremität gesetzt. Danach wurde den Mäusen die Milz entnommen, die dann bis zur Verwendung in BSS/BSA gegeben wurde.

Erstellung einer Zellsuspension aus einer Mausmilz

Die Milz wurde nach Entnahme aus der Maus mit einem sterilen 70 μm Zellsieb und einem passenden Stempel zerrieben, sodass eine Zellsuspension entstand.

Diese wurde dann in ein 50 ml Röhrchen überführt, welches dann bei 1600 RPM für 5 min bei RT zentrifugiert wurde. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 3 ml ddH₂O aufgenommen. Durch osmotische Hämolyse in der nun elektrolytarmen Umgebung sterben in dieser Situation insbesondere die Erythrozyten ab, während die kernhaltigen Zellen zunächst überleben. Um zu verhindern, dass auch die PBMCs zu Grunde gingen, wurden sofort weitere 3 ml 1,8% NaCl-Lösung hinzugegeben, um eine 0,9%-ige und damit isotonische Lösung zu erhalten.

Danach wurde das 50 ml Röhrchen für etwa 5 min auf Eis gestellt, wodurch sich die toten Zellen am Boden absetzten. Daraufhin wurde der Überstand mit den lebendigen Zellen in ein neues 50 ml Röhrchen überführt, welches dann bei 1600 RPM für 5 min bei RT zentrifugiert wurde. Zuletzt wurden die Zellen dann in BSS/BSA aufgenommen.

Gewinnung von PBMCs durch Ficoll-Dichtezentrifugation

Ein Leucosep-Röhrchen wurde mit 15 ml Leukozytenseparationsmedium befüllt und für etwa 17 Sekunden bei 1600 RPM zentrifugiert, sodass sich die Lösung unterhalb der Membran befand. Das Blutmaterial von Thrombozytenspendern (ca. 5-8 ml) wurde zunächst mit 10 ml PBS verdünnt, bevor es auf das Leucosep-Röhrchen gegeben und das Röhrchen für 30 min ohne Bremse bei 1200 RPM und RT zentrifugiert wurde.

Aufgrund von Dichteunterschieden der verschiedenen Blutbestandteile lagern sich bei diesem Vorgang die mononukleären Zellen in einer dünnen Schicht oberhalb der Membran an. Diese Schicht wurde dann mit einer Pasteurpipette entnommen und mit kaltem BSS/BSA dreimal bei 1600 RPM für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach in das Medium für humane Zellen (siehe Material) aufgenommen.

Ermittlung der Zellzahl mit Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahl von Einzelzellsuspensionen wurde nach Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurden die Zellen meist 1:10 oder 1:20 in Trypanblau eingesetzt und anschließend 10 μl der Lösung zwischen Deckgläschen und Neubauer-Zählkammer gegeben. Danach wurden die Zellen im Lichtmikroskop gezählt und die Zellzahl errechnet.

CFSE-Markierung

Für einige Experimente wurden die Zellen mit Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) markiert. Dabei handelt es sich um einen fluoreszenten Zellfarbstoff, den die Zellen aufnehmen und der bei jedem Teilungsschritt auf die beiden Tochterzellen verteilt wird, wobei die Intensität der Fluoreszenz aufgrund der verringerten Molekülmenge abnimmt. Auf diese Weise kann das Proliferationsverhalten mithilfe eines Durchflusszytometers analysiert werden.

Nach Isolation der PBMCs aus den Blutproben durch Ficoll-Dichtezentrifugation wurden die Zellen zunächst zwei Mal mit BSS gewaschen und anschließend auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Als nächstes wurden die Zellen mit $5 \mu\text{M}$ CFSE für 5 min im Dunkeln inkubiert. Abschließend erfolgten drei Waschschrte mit BSS/BSA wonach die Zellen in humanes Medium aufgenommen werden konnten.

Isolation CD4^+ Zellen aus humanen PBMCs

Für die Isolation von CD4^+ T-Zellen aus PBMCs wurde das MagniSort Human CD4 T cell Enrichment Kit von affymetrix, eBioscience verwendet. Bei dieser Methode binden die unerwünschten CD4^- Zellen zunächst an biotinylierten Antikörpern und anschließend an magnetische, mit Streptavidin beschichtete Partikel. Mithilfe eines Starkmagneten können die CD4^+ Zellen anschließend isoliert werden, da alle anderen Zellen am Magneten gebunden sind.

Das Experiment wurde anhand der Herstellerangaben (MagniSort Negative Selection Protocol II) durchgeführt. Die Reinheit der gewonnenen Zellproben an CD4^+ Zellen wurde mit einem Durchflusszytometer überprüft.

Isolation $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ regulatorischer T-Zellen aus humanen PBMCs

Zur Isolation von $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ Treg-Zellen wurde das $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{CD127}^{\text{dim}/-}$ Reg. T Cell Isolation Kit II human von Miltenyi Biotec verwendet. Die Anwendung dieses Kits beinhaltet zwei Schritte: Einen ersten Schritt zur Isolation von $\text{CD4}^+ \text{CD127}^{\text{low}}$ T-Zellen und einen zweiten Schritt zur Isolation von CD25^+ Treg-Zellen aus dieser Population.

Bei Anwendung dieses Verfahrens konnte jedoch lediglich eine geringe Reinheit von 30 bis 40 % an $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+$ Treg-Zellen erzielt werden. Weiterhin waren für die Fragestellungen in dieser Arbeit keine Selektion von Treg-Zellen bezüglich der Expression von CD127 vorgesehen, sondern vielmehr sollten CD25^+ Treg-Zellen $\text{CD25}^- \text{Tconv}$ -Zellen gegenübergestellt werden. Alternativ dazu wurden daher zunächst CD4^+ T-Zellen

durch das “MagniSort Human CD4 T cell Enrichment Kit“ von affymetrix, eBioscience isoliert und anschließend nur der zweite Isolationsschritt des “CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-} Reg. T Cell Isolation Kit II human“ durchgeführt. Das Experiment wurde nach der CD4⁺Isolation entsprechend den Angaben ab Punkt 2.4 in der Anleitung des Herstellers fortgesetzt. Durch diese Methode konnten mit hoher Reinheit CD25⁺ von CD25⁻ CD4⁺ T-Zellen getrennt werden.

Kultivierung von Zellen in der “Hohen Dichte Kultur“

Bei vielen der durchgeführten Zellkulturexperimente erfolgte nach der Isolation der PBMCs zunächst eine Kultivierung von Zellen in einer sogenannten “Hohen Dichte Kultur“ (HDK). Dabei wurden die Zellen im humanen Medium ohne Zugabe weiterer Komponenten, für zwei Tage im Brutschrank kultiviert. Dafür wurden 1,5 ml der Zellsuspension mit einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in einen Napf einer 24-Napf-Flachbodenplatte gegeben und im Inkubationsschrank kultiviert.

Durch die Kultivierung von Lymphozyten in dieser hohen Konzentration kann der Zustand der Zellen an die Situation im lymphatischen Gewebe angenähert werden. Durch Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten formieren die Zellen, insbesondere T-Zellen, Signalplattformen an der Zelloberfläche. T-Lymphozyten sprechen daher nach Vorbehandlung in der HDK besser auf eine pharmakologische Beeinflussung entsprechender Signalwege an [129].

Zellkultivierung in 96-Napf-Rundboden-Platte

Nach Isolation der PBMCs und gegebenenfalls HDK-Vorbehandlung, wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in einem Volumen von 200 μ l in einer 96-Napf-Rundboden-Platte kultiviert. Den Kulturen wurden je nach Experiment die entsprechenden Mengen an Inhibitoren (Sertralin, Citalopram, ARC39), Stimulantien (α CD3, α CD28, IL-2) und anderen Molekülen (C6/16-Ceramid) beigegeben. Abgesehen von den Experimenten mit Recallantigenen, bei denen eine Kultivierung über sechs Tage erfolgte, wurden die Zellen für vier Tage im Brutschrank kultiviert.

Durchflusszytometrie

Für die Messung von zellulären Expressionsmarkern mittels Durchflusszytometrie werden die Zellen zunächst mithilfe von Antikörpern gefärbt. Es handelt sich dabei um Konjugatantikörper, die mit einem jeweiligen Farbstoff markiert sind. Nach Anlagerung der Antikörper an die entsprechenden Zellstrukturen und unter Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe, können

die Zellen so gleichzeitig auf mehrere Marker hin untersucht werden (vgl. Abb.2.1).

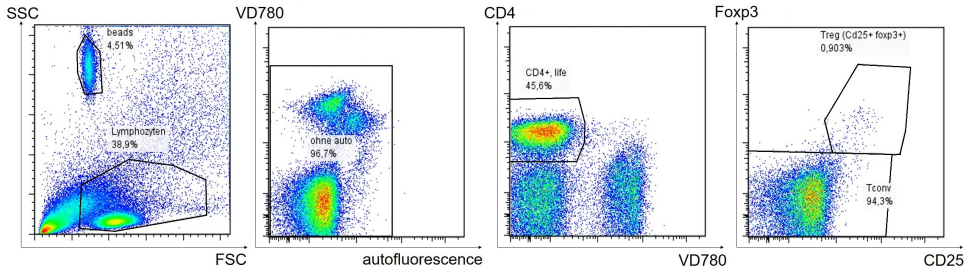


Abb. 2.1: Gating-Strategie zur Identifizierung der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen

Färbung von Expressionsmarkern an der Zelloberfläche

Für die Färbung von Expressionsmarkern an der Zelloberfläche wurden die Zellen in eine 96-Napf-V-Bodenplatte überführt und bei 1600 RPM für 3 min mit FACS-Puffer gewaschen. Nach Abkippen des Überstands wurden die Zellpellets in mit FACS-Puffer-verdünntem nmIg (Endkonzentration von 20 μ M/ml) aufgenommen und für 15 min im Dunkeln in einer mit Eis gefüllten Styroporbox inkubiert. Durch das normale Maus IgG werden in diesem Schritt unspezifische Bindungsstellen an der Zelloberfläche blockiert. Als nächstes wurden die Zellen durch Zugabe der entsprechenden Konjugat-antikörper für 30 min im Dunkeln bei 4 °C gefärbt. Danach wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit dem Durchflusszytometer untersucht, sofern nicht noch eine Intrazellulärfärbung durchgeführt wurde.

Färbung intrazellulärer Marker

Um im Anschluss an die Oberflächenfärbung noch intrazelluläre Bestandteile zu färben, wurden die Zellen für 30 min im Dunkeln bei RT mit Fixations-/Permeabilisierungspuffer fixiert. Danach wurden die Zellen einmal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern für 45 min im Dunkeln bei RT gefärbt.

Danach erfolgte erneut ein Waschschritt mit Permeabilisierungspuffer. Abschließend wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und dann am Durchflusszytometer analysiert. In einigen Experimenten wurden dem FACS-Puffer zuvor noch eine festgelegte Anzahl an ungelabelten Zählpartikel (counting beads) hinzugegeben, um so in der Messung auch die absoluten

Zellzahlwerte errechnen zu können.

Zellsortierung durch FACS

Für die Depletionsexperimente wurden PBMCs anhand ihrer Oberflächenmarker mithilfe eines FACS (fluorescence activated cell sorting) - Gerätes sortiert. Hierfür wurden die PBMCs in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml zunächst für 15 min bei 4°C im Dunkeln mit entsprechenden Konjugatantikörpern für CD4, CD25 und CD45RA gefärbt. Anschließend wurden am FACS-Gerät CD4^- , CD4^+ und $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ Zellen sortiert. Für die Depletionsexperimente wurden ruhende $\text{CD45RA}^+ \text{CD25}^+$, sowie aktivierte $\text{CD45RA}^- \text{CD25}^{++}$ Treg-Zellen identifiziert und aus den Zellproben entfernt. Die Zellen wurden nach dem Auffangen in eine Lösung aus 50% humanem Medium und 50% FCS aufgefangen und nach einem abschließenden Waschvorgang in humanes Medium aufgenommen.

Durchflusszytometrisch konnten Reinheiten von $>90\%$ für CD4^+ Zellen, $>95\%$ für die Treg-Zelldepletion und $>99\%$ für CD4^- Zellen bestätigt werden.

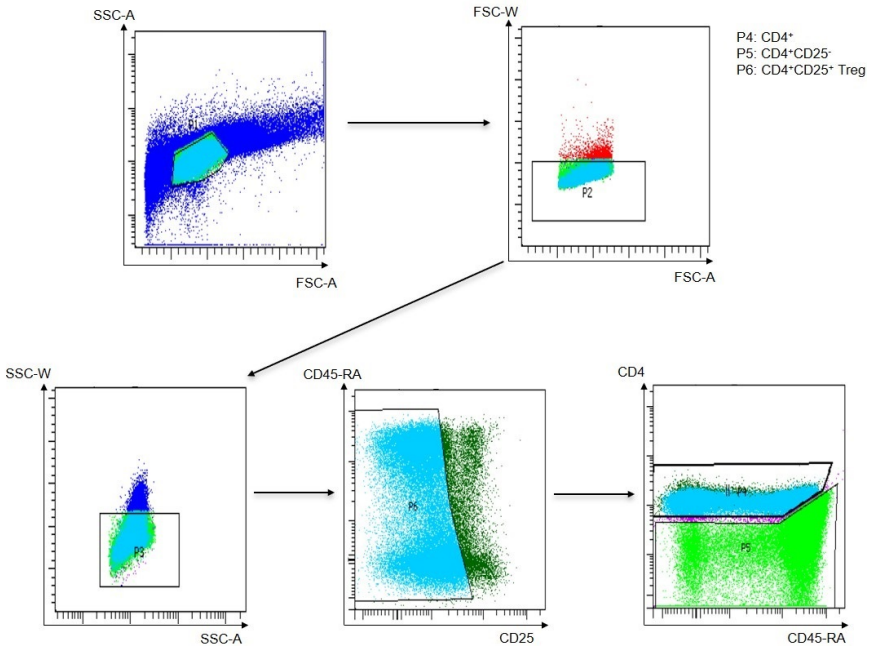


Abb. 2.2: Gating-Strategie zur Zellsortierung. Die verschiedenen Subpopulationen der PBMCs wurden durch Färbung mit den Oberflächenmarkern identifiziert und es konnte eine Depletion von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen durchgeführt werden.

Bestimmung von Zytokinkonzentrationen im Zellüberstand

Für die Konzentrationsbestimmung von Zytokinen im Zellüberstand humaner PBMCs wurde das LEGENDplex Multi-Analyte Flow Assay Kit von Biolegend verwendet. Das Experiment wurde entsprechend den Herstellerangaben in der dem Kit beiliegenden Anleitung durchgeführt. Es handelt sich bei dem System um einen sogenannten “sandwich immunoassay“. Dabei werden für jedes Zytokin spezifische “capture beads“ eingesetzt, die sich in Größe und innerer Fluoreszenzintensität eindeutig voneinander unterscheiden lassen. Jede Art von capture bead bindet ein Molekül der entsprechenden Zytokinart. Anschließend hinzugegebene Detektionsantikörper binden das mit einem capture bead markierte Zytokin.

Zugegebenes Streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) bindet wiederum an die Detektionsantikörper, wodurch der Komplex ein Fluoreszenzsignal im PE-Kanal erhält, dessen Intensität dann proportional zur Zytokinkonzentration ist. Über das PE-Signal und gleichzeitiges Messen von Standardkonzentra-

tionen, kann nach eindeutiger Unterscheidung der jeweiligen bead-Arten die Menge an Zytokinen im Zellüberstand errechnet werden.

Fluorometrische Messung der ASM-Aktivität nach Inhibitorbehandlung

Um die hemmende Wirkung verschiedener Substanzen auf die ASM-Aktivität zu untersuchen wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen zunächst für 2 h bei 37°C und 5% CO_2 im Inkubationsschrank mit den Inhibitoren kultiviert. Im Anschluss daran wurde ein fluorometrischer Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität durchgeführt. Bei diesem Experiment wird das Molekül HMU-PC verwendet, das ebenfalls durch die saure Sphingomyelinase umgesetzt werden kann und dabei ein fluoreszierendes Produkt bildet. Die Menge des gebildeten Produkts ist proportional zur Aktivität der sauren Sphingomyelinase, sodass durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität die relative Enzymaktivität ermittelt werden kann.

Die Eppendorfgefäße mit den Zellen der Inhibitorbehandlung wurden zunächst bei 8000 RPM für 1 min zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in $40 \mu\text{l}$ ASM-Puffer aufgenommen.

Daraufhin wurden die Zellen durch mehrmaliges kurzzeitiges Einfrieren der Probe im -80°C Gefrierschrank und anschließendes Auftauen im Wasserbad lysiert und anschließend bei 6000 RPM für 30 Sekunden erneut zentrifugiert. $10 \mu\text{l}$ des Zellysats wurden dann zu einer Lösung aus $10 \mu\text{l}$ ASM-Puffer, $10 \mu\text{l}$ HMU-PC und $1,3 \mu\text{l}$ 30mM EDTA hinzugegeben. Gegebenenfalls wurden zwei bzw. drei Ansätze je Probe erstellt. Da die ASM im Zellysat einige Zeit benötigt um größere Mengen des HMU-PC zu spalten wurden die Proben über Nacht in den Inkubationsschrank gestellt.

Nach etwa 17 h wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von $200 \mu\text{l}$ Stopp-lösung blockiert. Nach Überführung der Proben in eine schwarze 96-Napf-Flachbodenplatte konnte die Enzymaktivität durch Messung der Fluoreszenzintensität bestimmt werden.

Einstellungen am SAFIRE II Fluoreszenzmessgerät: Extinktion: 404 nm, Emission 460 nm, Bandbreite 20 nm, Plate: GRE96fb

Ethikerklärung

Die Blutproben zur PBMC-Gewinnung für die humanen In-Vitro-Experimente wurden durch das Universitätsklinikum Würzburg zur Verfügung gestellt hat. Es handelte sich dabei um anonyme Proben aus der Thrombozytenspende am Insituts für Transfusionsmedizin.

3. Ergebnisse

3.1 Pharmakologische Hemmung der ASM in Mäusen

3.1.1 ASM-Inhibition durch Sertralin und Citalopram

Anknüpfend an die wissenschaftlichen Forschungsarbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass eine pharmakologische Inhibition der sauren Sphingomyelinase durch FIASMAs weitreichende Auswirkungen auf die Subpopulationen der T-Zellen in Mäusen haben, wurde zunächst die inhibitorische Wirkung von Sertralin und Citalopram auf Maus-T-Zellen untersucht.

Hierzu wurde die ASM-Aktivität von Milzzellen nach Inkubation mit den Inhibitoren in einem fluorometrischen Enzym-Assay bestimmt. Da die Intensität der gemessenen Fluoreszenz mit der Aktivität der sauren Sphingomyelinase korreliert, konnte die relative Enzymaktivität ermittelt werden.

Während eine weitreichende Hemmung der sauren Sphingomyelinase bereits nach Zugabe geringer Mengen an Sertralin ($EC_{50}=1,34\mu M$) erreicht wurde, konnte mit Citalopram ($EC_{50}=18,1\mu M$) erst nach weiterer Erhöhung der Konzentration eine bedeutende Enzymhemmung erlangt werden (vgl. Abb. 3.1). Somit konnten wir bestätigen, dass mit Sertralin und Citalopram zwei potente Hemmstoffe der ASM zu Verfügung stehen, die sich in ihrer Hemmstärke jedoch voneinander unterscheiden und somit zur Untersuchung von enzymabhängigen Effekten geeignet sind.

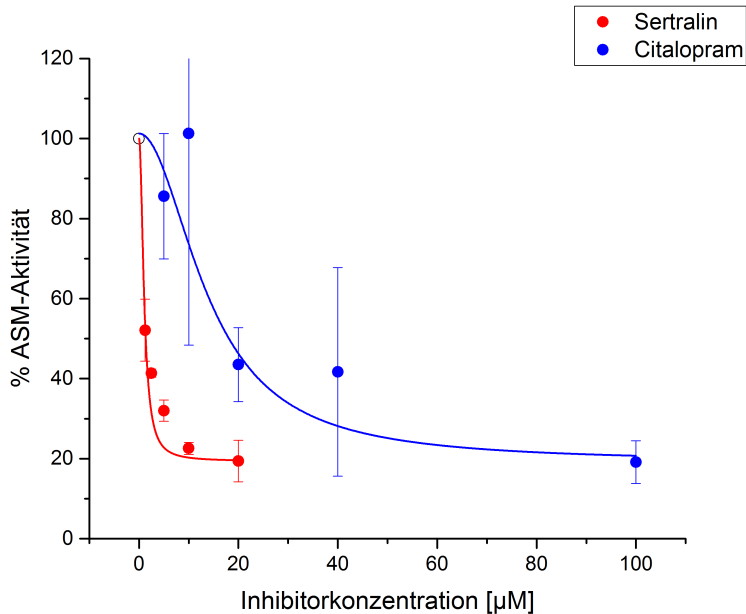
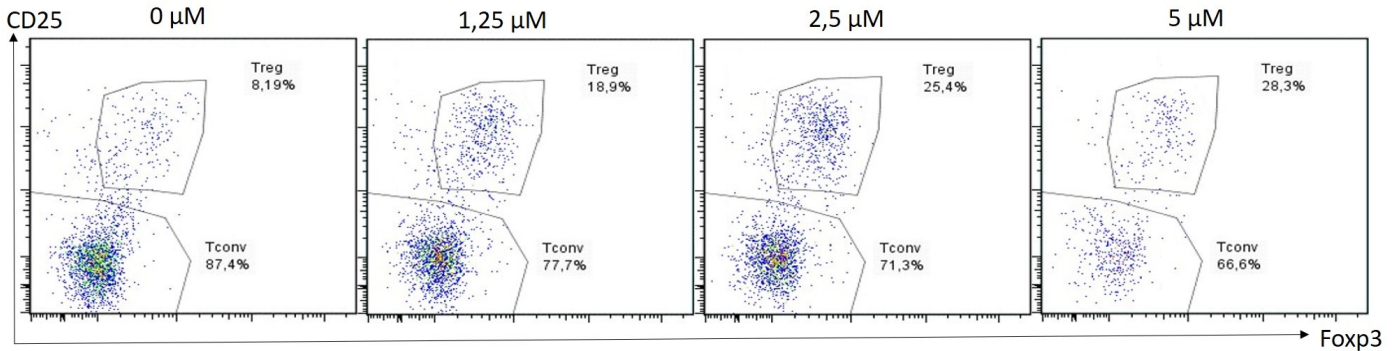


Abb. 3.1: Enzymaktivität nach Zugabe der ASM-Inhibitoren. Gemessene Aktivität der sauren Sphingomyelinase in Mausmilzzellen nach zweistündiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Sertralin und Citalopram. Dargestellt sind die Datenpunkte mit dazugehörigen Standardabweichungen. Kurvenanpassung nach Hill-Funktion $n=3$.

3.1.2 Erhöhung der Treg-Zellfrequenzen durch ASM-Inhibition

In früheren Forschungsarbeiten konnte eine Erhöhung der Treg-Zellfrequenzen nach Kultivierung von Mauszellen mit den ASM-Inhibitoren Desipramin und Amitriptylin in Anwesenheit von IL-2 festgestellt werden. In Analogie dazu wurden in einem weiteren Experiment Milzzellen aus Mäusen zusammen mit Sertralin bzw. Citalopram sowie IL-2 (Konzentration 10^{-6}M) für einen Zeitraum von 4 Tagen kultiviert. Die Zellen lagen dabei in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml ohne weitere Stimulantien vor und wurden nach der Kultur mithilfe eines Durchflusszytometers analysiert. Sowohl für Sertralin, als auch für Citalopram, konnte ein dosisabhängiger Anstieg der %-Treg-Zellen ($\text{CD}25^+ \text{Foxp}3^+ / \text{CD}4^+$) nach Zugabe der Inhibitoren festgestellt werden (vgl. Abb.3.2 und Abb.3.3).

sertraline



citalopram

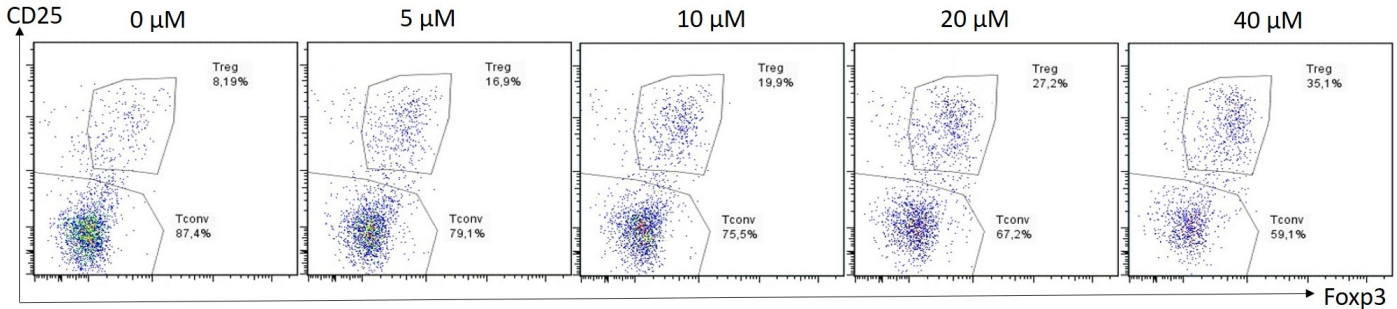


Abb. 3.2: Durchflusszytometrische Darstellung CD4⁺-gegateter Zellen einer Maus bezüglich ihrer Expression von CD25 und Foxp3. Repräsentatives Einzelexperiment von insgesamt 3 Ansätzen.

Für Sertralin trat dieser Effekt bereits bei niedrigen Konzentrationen ($<5 \mu\text{M}$) auf, wohingegen größere Mengen an Citalopram nötig waren, um eine ähnliche Steigerung der Treg-Zellfrequenz zu erreichen (vgl. Abb. 3.3). Gleichzeitig ging eine erhöhte Inhibitorkonzentration auch mit zunehmender Zytotoxizität einher, wodurch die Gesamtzahl an CD4^+ Zellen abnahm. Dies zeigte sich sowohl an einer Verringerung des Anteils an lebendigen ($\text{VD780}^{\text{low}}$) Zellen, als auch an einer Verringerung der absoluten Zellzahlen. Insbesondere die Population der $\text{CD25}^- \text{Foxp3}^- \text{Tconv}$ -Zellen nahm nach Zugabe hoher Konzentrationen an Sertralin ($5 \mu\text{M}$) und Citalopram ($40 \mu\text{M}$) ab (vgl. Abb.3.4). In die durchflusszytometrischen Analyse wurden entsprechend dem Gating nur lebende, $\text{VD780}^{\text{low}}$ -Zellen eingeschlossen.

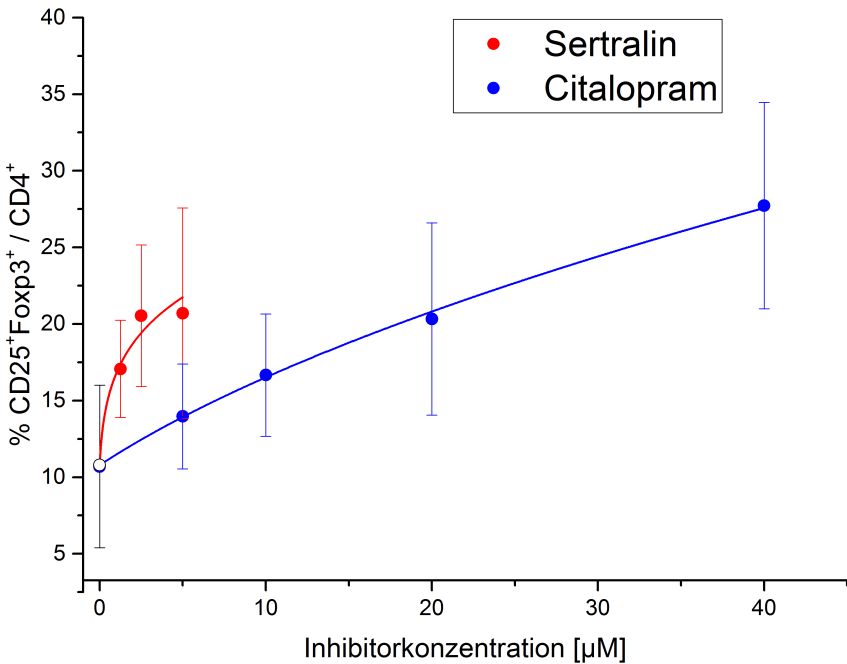


Abb. 3.3: Anteil $\text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+$ an CD4^+ Zellen im Mausexperiment nach Zugabe der ASM-Inhibitoren Sertralin und Citalopram. Dargestellt sind die Messpunkte mit dazugehörigen Standardabweichungen. Kurvenanpassung nach Hill-Funktion $n=3$.

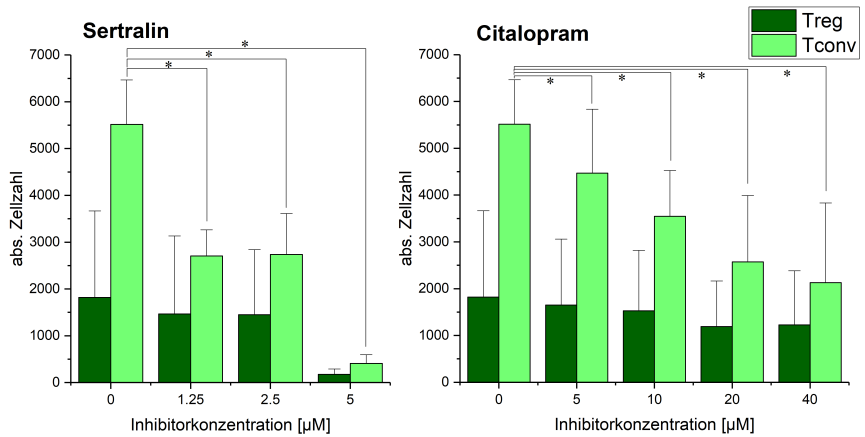


Abb. 3.4: Absolute Zellzahlen an Treg- und Tconv-Zellen nach Kultivierung von Mauszellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Sertralin und Citalopram für vier Tage. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung n=3.

3.2 Inhibition der ASM im Menschen

Somit erscheinen Sertralin und Citalopram als geeignete Inhibitoren, die in der Lage sind, die in der Maus beschriebenen immunmodulatorischen Wirkungen auszuüben.

Um die für die vorliegende Arbeit wesentliche Fragestellung nach der ASM-abhängigen Einflussnahme auf humane T-Zellen zu untersuchen, wurden daher zunächst Experimente zur Übertragung des experimentellen Aufbaus von der Maus auf den Menschen durchgeführt. Diese sollen nun im Folgenden besprochen werden.

3.2.1 Hemmung der ASM in CD4⁺ T-Zellen

In folgendem Experiment wurden CD4⁺ Zellen durch Magnetisolation aus humanen PBMCs aufgereinigt (Reinheit von ca. 90%) und für zwei Stunden mit der jeweiligen Konzentration des ASM-Inhibitors inkubiert. Anschließend erfolgte die fluorometrische Messung der Enzymaktivität.

Ähnlich wie bei Maus-T-Zellen zeigte sich bei den humanen CD4⁺ T-Zellen eine dosisabhängige Hemmung der Enzymaktivität, die bei Sertralin (EC50=0,81 µM) stärker und schon bei geringeren Konzentrationen ausfiel als bei Citalopram (EC50=20,1 µM; Abb.3.5).

Insoweit findet sich eine Entsprechung der Situation in der Maus auch im Menschen.

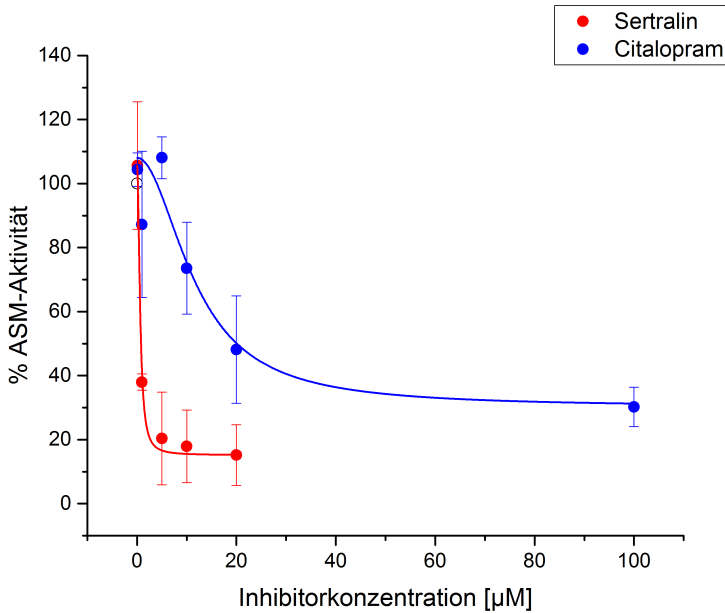


Abb. 3.5: Enzymaktivität in $CD4^+$ T-Zellen nach Zugabe der ASM-Inhibitoren. Dargestellt sind die Messpunkte mit dazugehörigen Standardabweichungen. Kurvenanpassung nach Hill-Funktion $n=3$.

3.2.2 Hemmung der ASM in Tconv- und Treg-Zellen

Um die Inhibition der sauren Sphingomyelinase in T-Zellen noch weiter aufzuklären, wurden Treg- und Tconv-Zellen durch Magnetisolation aus $CD4^+$ T-Zellen isoliert. Nach Behandlung dieser Zellen mit 0, 0,2, 1 und 5 μM Sertraline wurde die ASM-Aktivität bestimmt. Bedauerlicherweise gelang es nicht, eine reine Treg-Zellpopulation zu generieren: Während die Isolation gesamt $CD4^+$ T-Zellen mit $>90\%$ $CD4^+$ erfolgreich war, wurden nach der magnetischen Isolation $CD25^+$ Zellen lediglich Frequenzen zwischen 56% und 64% an $CD25^+ Foxp3^+$ Zellen erreicht.

Ohne Zugabe eines Inhibitors war die ASM-Aktivität in den mit regulatorischen T-Zellen angereicherten Proben gegenüber den Proben der konventionelle T-Zellen durchschnittlich um 51,7% erhöht.

Durch Zugabe von Sertraline konnte die saure Sphingomyelinase sowohl in Treg-Zellen ($EC_{50}=0,92 \mu M$) als auch in Tconv-Zellen ($EC_{50}=0,56 \mu M$) wirksam gehemmt werden, sodass es bei höheren Inhibitorkonzentrationen zu einer Angleichung der Enzymaktivität in beiden Zelltypen kam (Abb.3.6).

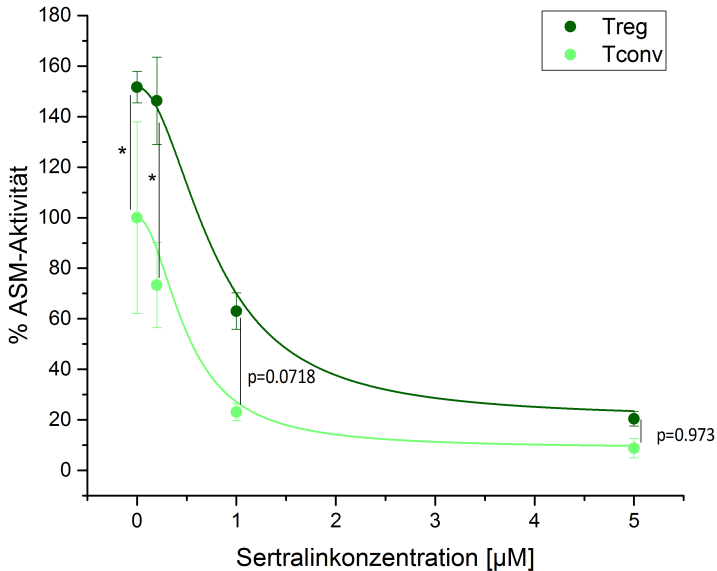


Abb. 3.6: ASM-Aktivität in $CD4^+$ Treg- und Tconv-Zellen nach Zugabe von Sertralin. Die ASM-Aktivität unbehandelter Tconv-Zellen wurde als 100% festgelegt. Dargestellt sind die Messpunkte mit dazugehörigen Standardabweichungen. Kurvenanpassung nach Hill-Funktion. * $p < 0,05$ ANOVA-Test mit Tukey-Post-Hoc-Analyse $n=3$.

Durch Zugabe der höchsten gemessenen Konzentration von $5 \mu\text{M}$ konnte die durchschnittliche ASM-Aktivität von 151,7% für Treg-Zellen und 100% für Tconv-Zellen (Differenz=51,7%) auf 20,4% für Treg-Zellen und 8,8% für Tconv-Zellen (Differenz=11,6%) vermindert werden.

3.3 Etablierung in vitro Assay human

3.3.1 Behandlung humaner PBMCs mit Sertralin und Citalopram

Um zu untersuchen, inwieweit die Effekte der ASM-Inhibition auf regulatorische und konventionelle T-Zellen sowie die inhibitorabhängige Erhöhung des Treg-Anteils an $CD4^+$ T-Zellen auch im Menschen Bestand hat, wurden humane PBMCs zunächst ohne Inhibitoren für zwei Tage mit einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in einer "Hohen Dichte Kultur" (HDK) kultiviert.

Hierdurch erhalten die Zellen die Möglichkeit, Zell-Zell-Kontakte auszubilden, wodurch die Kultur an den Zustand im Gewebe angenähert wird und ein potentielles Ansprechen der Zellen auf pharmakologische Einflüsse verbessert wird.

Nach dieser Vorbehandlung wurden die Zellen in niedrigerer Konzentration zusammen mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren (0,2 μM , 1 μM und 5 μM für Sertralin; 1 μM , 10 μM und 40 μM für Citalopram) für vier Tage im Brutschrank kultiviert. In der durchflusszytometrischen Messung ergab sich ein signifikant erhöhter Anteil an Foxp3⁺ CD25⁺ Treg-Zellen bei Behandlung der Zellen mit 1 μM Sertralin. Diese Vermehrung regulatorischer T-Zellen von durchschnittlich 0,56% auf 1,02% entspricht absolut einem Anstieg um 0,46%, während es relativ eine Zunahme um 82% darstellt (Abb. 3.7).

Eine erhöhte Treg-Zellfrequenz bei Kultivierung der Zellen mit 1 μM Sertralin trat bei 20 von insgesamt 24 (=83,3%) gesunden Blutspendern auf. Bei einer Konzentration von 5 μM Sertralin kam es jedoch wieder zu einer Verringerung des Anteils an regulatorischen T-Zellen.

Für den schwächeren ASM-Inhibitor Citalopram ergab sich eine geringfügige, nicht signifikante Erhöhung des Anteils an regulatorischen T-Zellen bei Behandlung der Zellen mit 1 μM (+32% Treg-Zellen), sowie mit 10 μM (+34% Treg-Zellen) des Inhibitors.

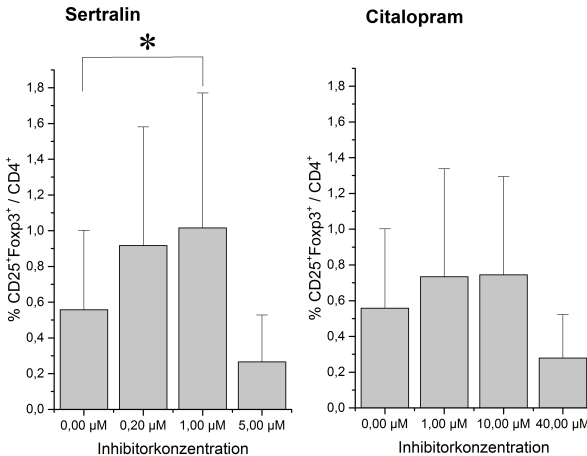


Abb. 3.7: Anteil Foxp3⁺ CD25⁺ Treg-Zellen an CD4⁺ nach Behandlung mit Sertralin und Citalopram. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. *p<0,05 in zweiseitigem Student's T-Test. n=21-24

Durch Ermittlung der absoluten Zellzahlen an Treg- und Tconv-Zellen konnte festgestellt werden, dass die %Treg-Zellerhöhung mit einer Vermehrung der absoluten Zellzahlen an regulatorischen T-Zellen und einem Rückgang der absoluten Zellzahlen an konventionellen T-Zellen einhergeht (Abb. 3.8).

Zytotoxische Effekte durch die Inhibitoren konnten lediglich bei einer

Konzentration von $5\mu\text{M}$ Sertralin beobachtet werden, was in Form eines verringerten Anteils an CD4^+ lebendigen ($\text{VD780}^{\text{low}}$) Zellen beobachtet wurde (Verringerung CD4^+ $\text{VD780}^{\text{low}}$ Zellen von 45,79% ohne Sertralin auf 34,58% bei Zugabe von $5\mu\text{M}$ Sertralin). Niedrigere Konzentrationen an Sertralin, sowie sämtliche Konzentrationen an Citalopram wiesen hier keine zytotoxischen Effekte auf (Abb.3.8).

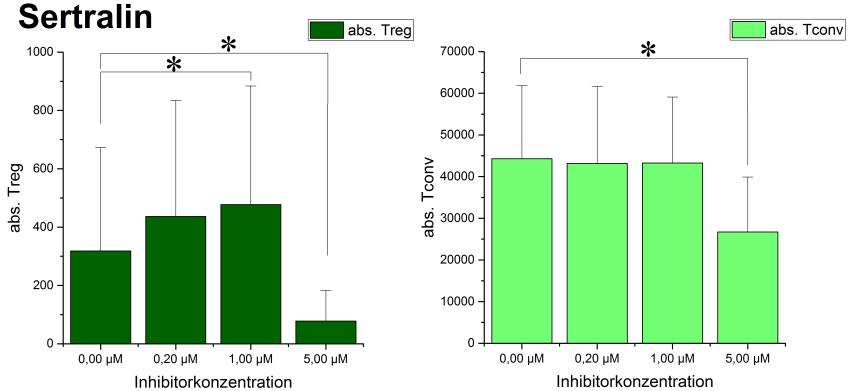


Abb. 3.8: Absolute Zellzahlen an Treg- und Tconv-Zellen nach Behandlung mit Sertralin. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * $p < 0,05$ in ANOVA-Test mit Tukey-Post-Hoc-Analyse $n=24$.

Weiterhin konnte eine verstärkte Expression des Oberflächenmarkers CD69 nach Kultivierung der Zellen in Anwesenheit der ASM-Inhibitoren beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die PBMCs, welche mit der höchsten Konzentration des jeweiligen Inhibitors kultiviert wurden, exprimierten dabei auch die größten Mengen an CD69. Die Wirkung von Sertralin war auch hier stärker als die von Citalopram.

3.3.2 Kultivierung humaner PBMCs mit ASM-Inhibitoren in Anwesenheit von IL-2

In Analogie zu den Mausexperimenten wurden die Zellen in einem weiteren Experiment nach HDK-Vorbehandlung zusätzlich zu den Inhibitoren in Anwesenheit von $1\mu\text{M}$ IL-2 kultiviert. Anders als im Mausmodell ließen sich nach Zugabe von Sertralin und Citalopram in menschlichen Zellen keine Veränderungen bezüglich des Anteils an regulatorischen T-Zellen erkennen (Untersuchte Konzentrationen: $0\mu\text{M}$, $0,1\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ $n=1-4$, Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde auch Desipramin getestet, für welches in anderen Forschungsarbeiten in Anwesenheit von IL-2 ebenfalls ein Treg-Anstieg in Mäusen gezeigt werden konnte.

Auch nach ASM-Inhibition durch Desipramin zeigte sich jedoch keine Änderung der Treg-Zellfrequenz, was auch nach einer Verlängerung des Kultivierungszeitraums auf bis zu 20 Tage gleich blieb.

Neben dem Anteil an regulatorischen T-Zellen wurde auch die Expression von CD25, CD69 und CTLA-4 in den Zellen analysiert, wobei sich jedoch bei keinem der Inhibitoren eine tendenzielle Veränderung im Expressionsverhalten von Treg- oder Tconv-Zellen erkennen ließ.

3.3.3 Inhibitorabhängige Effekte auf Treg- und Tconv-Zellen bei Kultivierung mit α CD3-Antikörper

Da nach Zugabe von IL-2 in dem durchgeführten Experiment keine Effekte auf regulatorische und konventionelle T-Zellen erkennbar waren, erfolgte als nächstes, alternativ dazu eine Stimulation mit einem α CD3-Antikörper (Klon: HIT3a, Endkonzentration 0,1 μ g/ml).

Die Analyse aller Proben (n=18) zeigte eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Vermehrung regulatorischer T-Zellen bei ASM-Inhibition durch 0,2 μ M, 1 μ M und 5 μ M Sertralin (Daten nicht gezeigt). Eine Hemmung des Enzyms auch durch größere Mengen (bis zu 40 μ M) Citalopram ergab im Mittel hingegen keinen derartigen Effekt. Bei einem Teil der anonymen Blutspender (9 von 18) konnte eine dosisabhängige Erhöhung der Treg-Zellfrequenz nach Hemmung der ASM mit Sertralin festgestellt werden (Abb.3.9). Bei diesen "Respondern" kam es durchschnittlich zu einem stetigen Anstieg des Anteils an regulatorischen T-Zellen von 2,03% ohne Inhibitor auf 3,27% bei Zugabe von 5 μ M Sertralin (Abb.3.11).

Generell wurde als Kriterium zur Einteilung in Responder bzw. Non-Responder festgelegt, dass es bei mindestens zwei von drei Inhibitorkonzentration (0,2 μ M, 1 μ M und 5 μ M für Sertralin und 1 μ M, 10 μ M und 40 μ M für Citalopram) zu einem Anstieg der %Treg-Zellen kam. Um die fälschliche Erfassung reiner Messungenauigkeiten zu umgehen, wurde zusätzlich eine relative Treg-Zellerhöhung um mindestens 30% bei einer der Konzentration verlangt.

Die Analyse der absoluten Zellzahlen bei den Respondern für Treg- und Tconv-Zellen ergab mit einem Anstieg der Treg-Zellen bis zu einer Konzentration von 1 μ M Sertralin und einer grundsätzlichen Verringerung der Tconv-Zellen in Gegenwart des Inhibitors, ein ähnliches Ergebnis wie im unstimulierten Ansatz.

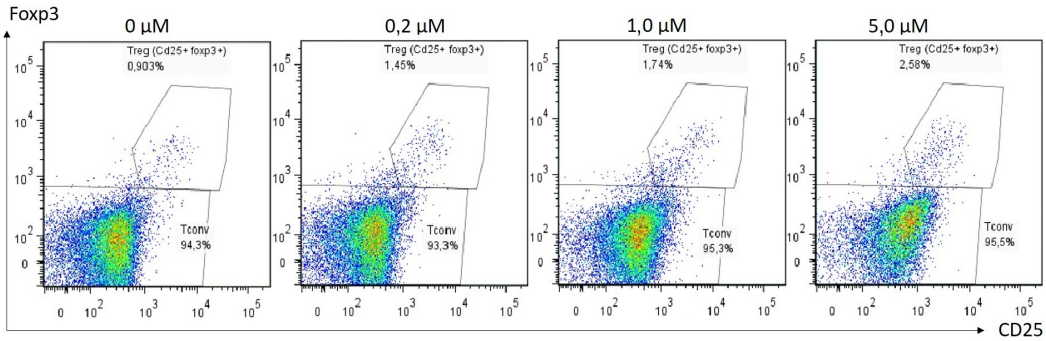


Abb. 3.9: Expression von CD25 und Fopx3 nach Kultivierung von PBMCs mit α CD3-Antikörper (Klon: HIT3a, Endkonzentration 0,1 μ g/ml) und unterschiedlichen Konzentrationen an Sertraline. Repräsentatives Beispiel von insgesamt neun Respondern.

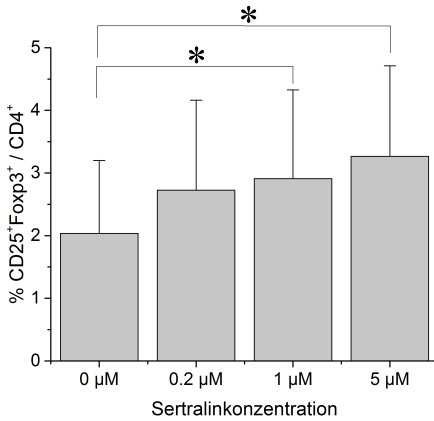


Abb. 3.10: Anteil regulatorischer T-Zellen an CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von 0,1 μ g/ml α CD3 mAb. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * $p < 0,05$ in zweiseitigem Student's T-Test. n=9 Responder von insgesamt 18 Spendern.

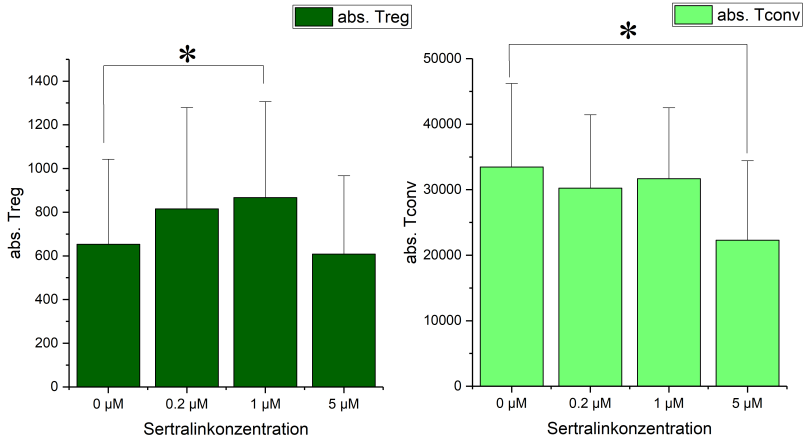


Abb. 3.11: absolute Zellzahlen nach ASM-Inhibition durch Sertralin in Anwesenheit von 0,1 µg/ml αCD3. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * $p < 0,05$ in ANOVA-Test mit Tukey-Post-Hoc-Analyse. $n=9$ Responder von insgesamt 18 Spendern.

Bei einem Teil der Spender (4 Responder von 18 Spendern) ergab sich der gleiche Effekt auch bei Zugabe von Citalopram, wobei der Treg-Anstieg schwächer ausfiel und höhere Konzentrationen des Inhibitors nötig waren (1,08% Treg-Zellen ohne Inhibitor, 1,58% Treg-Zellen nach Zugabe von 40 µM Citalopram, Daten nicht gezeigt). Bemerkenswerterweise waren alle 4 Responder für Citalopram zugleich auch Responder für Sertralin.

Weiterhin kam es durch die Stimulation von CD3 erwartungsgemäß zu einer vermehrten Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 in konventionellen und regulatorischen T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise exprimierten die stimulierten Treg-Zellen geringere Mengen an CTLA-4, wenn sie zusätzlich mit den ASM-Inhibitoren kultiviert wurden. Insbesondere die Zahl der CTLA-4^{hi} Zellen wurde dadurch reduziert (vgl. Abb. 3.13). Diese geringere CTLA-4-Expression nach Inhibitorzugabe war bei Sertralin stärker und bereits bei geringeren Konzentrationen ausgeprägt als bei Citalopram.

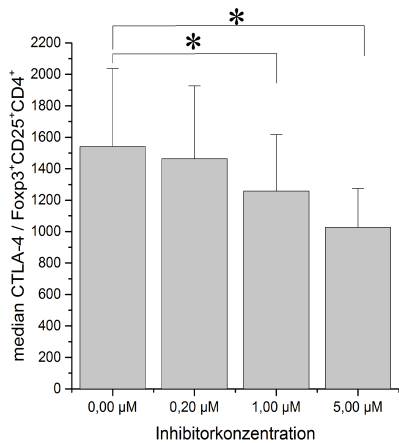
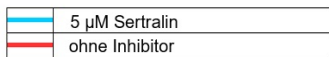
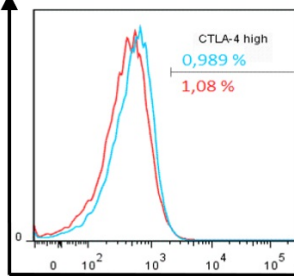


Abb. 3.12: Mediane Fluoreszenzintensität(MFI) für CTLA-4 in Treg-Zellen nach Inkubation mit Sertralin. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * $p < 0,05$ in ANOVA-Test mit Tukey-Post-Hoc-Analyse $n=18$.



Tconv

Zellzahl



Treg

Zellzahl

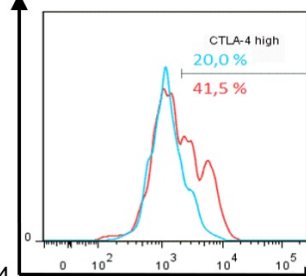


Abb. 3.13: Expression von CTLA-4 in regulatorischen und konventionellen T-Zellen nach viertägiger Behandlung mit 5 µM Sertralin (blau) bzw. ohne Inhibitor (rot). Repräsentatives Beispiel von insgesamt 18 durchgeführten Experimenten.

Für CD25 zeigte sich in den Treg-Zellen eine ähnliche Tendenz, die jedoch schwächer ausfiel als für CTLA-4 und keine statistische Signifikanz erreichte (Daten nicht gezeigt). In den Tconv-Zellen hingegen führte die Behandlung mit Sertralin zu einer Vergrößerung der medianen Fluoreszenzintensität von CD25 (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Expression von CD69 ergab weder bei den Treg noch bei den Tconv-Zellen eine signifikante Änderung der MFI für diesen Oberflächenrezeptor (Daten nicht gezeigt).

3.4 ASM-Inhibition unter Stimulation mit einem α CD28-Antikörper

Da neben der Stimulation von CD3 auch die Stimulation von CD28 für T-Zellen und insbesondere für regulatorische T-Zellen Bedeutung hat, wurde in einem weiteren Ansatz eine Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,01 μ g/ml, 0,10 μ g/ml, 1,00 μ g/ml und 10,00 μ g/ml; n=2-3) eines α CD28-Antikörpers (Klon: CD28.2) durchgeführt. Es handelte sich hierbei um eine reine CD28-Stimulation; der zuvor eingesetzte α CD3-Antikörper wurde in diesem Experiment nicht verwendet. Bei gleichzeitiger Zugabe von Sertralin bzw. Citalopram (gleiche Konzentrationen wie zuvor) konnte im Vergleich zu Ansätzen ohne Inhibitor keine Veränderungen des Anteils an Foxp3⁺CD25⁺ Treg-Zellen beobachtet werden (vgl. Abb. 3.14, exemplarisch bei Stimulation mit 0,1 μ g/ml α CD28-Antikörper).

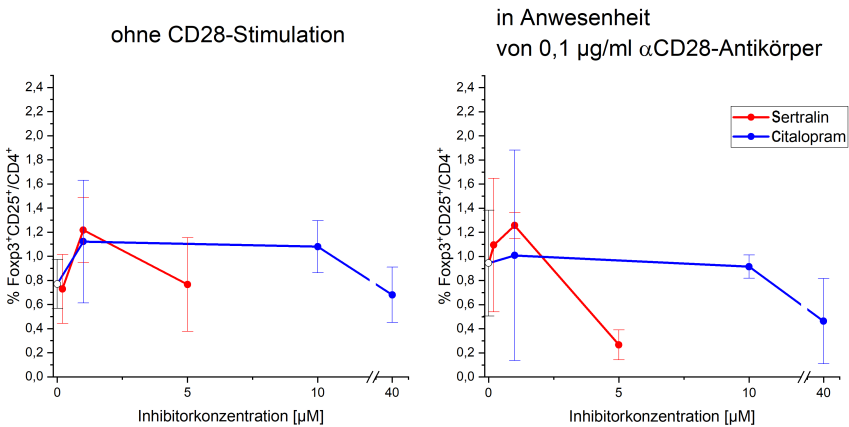


Abb. 3.14: Vergleich der Auswirkung von ASM-Inhibitoren (Sertralin in rot, Citalopram in blau) auf die Frequenz regulatorische T-Zellen mit (hier 0,1 μ g/ml α CD28-Antikörper) und ohne CD28-Stimulation. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung, n=3.

Abgesehen von einer erhöhten Expression von CD69 durch die T-Zellen bei einer Konzentration von 5 μ M Sertralin (bereits zytotoxische Effekte), ergab sich insgesamt keine signifikante Änderung im Expressionsverhalten von CD25, CD69 und CTLA-4 von Treg- und Tconv-Zellen (Daten nicht gezeigt).

3.5 Fehlende Vermehrung regulatorischer T-Zellen nach vorheriger Treg-Zelldepletion

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die inhibitorabhängige Vermehrung der regulatorischen T-Zellen durch eine vorherige Depletion der Treg-Zellen aus den PBMCs verhindert wird. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die Vermehrung der regulatorischen T-Zellen durch bereits bestehende Treg-Zellen bedingt ist.

Zu diesem Zweck wurden mithilfe eines FACS-Sortierers gesortete Gesamt-CD4⁺ Zellen und CD4⁺CD25⁻ Zellen (Treg-depletiert) aus PBMCs isoliert und anschließend entsprechend kultiviert. Zusätzlich zu CD25 wurde hierbei auch CD45RA gefärbt, wodurch eine Anpassung der durchflusszytometrischen Gates ermöglicht wurde, und gezielt ruhende CD45RA⁺ CD25⁺ Treg-Zellen und aktivierte CD45RA⁻ CD25⁺⁺ Treg-Zellen depletiert werden konnten (vgl. Abb.2.2).

An einer verringerten Treg-Zellfrequenz in Gesamt-CD4⁺-sortierten T-Zellen konnte beobachtet werden, dass nicht nur die Entfernung CD4⁺ CD25⁺ Zellen (Reinheit beim Sortieren 84,2-89,2%), sondern auch der Stress, der beim Sortierungsvorgang auf die Zellen ausgeübt wird, zum Absterben von regulatorischen T-Zellen führt.

Als Positivkontrolle wurden Kulturen mit unsortierten PBMCs angelegt, in welchen eine Vermehrung des Treg-Anteils an CD4⁺ T-Zellen bei Inkubation mit 5 μ M Sertralin beobachtet wurde. Dieser Effekt trat in abgeschwächter Form ebenfalls bei den Gesamt-CD4⁺-sortierten T-Zellen auf. In den Treg-zelldepletierten Kulturen (CD4⁺CD25⁻)-Zellen konnte der Effekt jedoch nicht nachgewiesen werden.

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei einer Konzentration von 1 μ M Sertralin zwischen Gesamt-CD4⁺-sortierten und Treg-zelldepletierten T-Zellen.

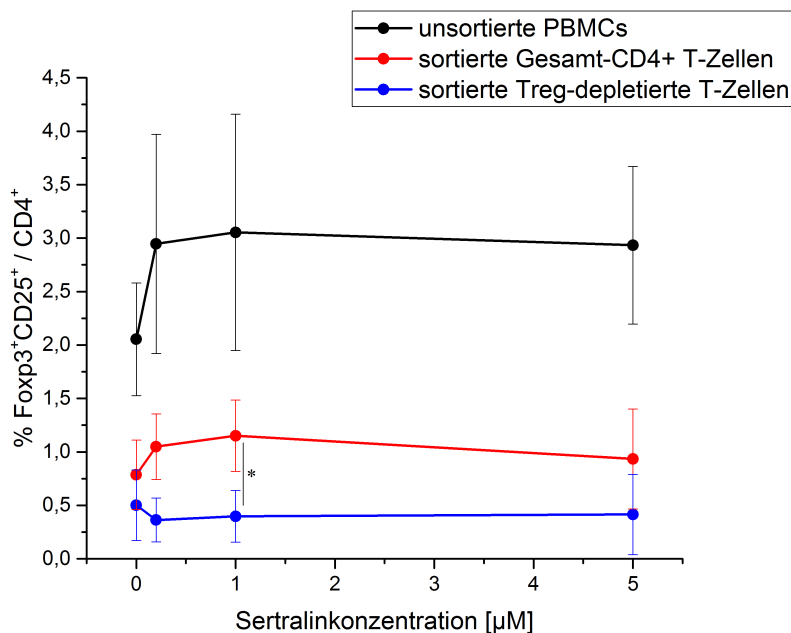


Abb. 3.15: Vergleich der Treg-Zellfrequenzen zwischen unsortierten, Gesamt $CD4^+$ sortierten und $CD4^+CD25^-$ sortierten Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Sertralin. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * $p < 0,05$ in ANOVA-Test mit Tukey-Post-Hoc-Analyse $n=3$.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass der beobachtete Anstieg der regulatorischen T-Zellen auf die bereits bestehenden Treg-Zellen zurückzuführen ist.

3.6 Bedeutung von Ceramid für regulatorische und konventionelle T-Zellen

3.6.1 Verminderte Menge an regulatorischen T-Zellen in Anwesenheit von C6-Ceramid

Zumal die Bildung des bioaktiven Lipids Ceramid aus Sphingomyelin den entscheidenden Schritt darstellt, der durch die saure Sphingomyelinase katalysiert wird, wurde in einem weiteren Experiment untersucht, welche

Auswirkungen eine externe Zufuhr des Ceramidderivats C6 auf CD4⁺ T-Zellen hat. Hierzu wurden die Zellen wieder in dem etablierten Setting nach vorheriger HDK in Anwesenheit von α CD3-Antikörper kultiviert.

C6 kommt physiologischerweise nur zu einem geringen Anteil in der Plasmamembran vor, während länger-kettige Formen wie C16 bis C24 den Hauptanteil der Ceramide bilden. Allerdings sind derart langkettige Moleküle für ein Zellkultorexperiment ungeeignet, zumal diese nur eingeschränkt von den Zellen internalisiert werden können.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse konnte festgestellt werden, dass die Kultivierung humaner PBMCs mit C6-Ceramid (5 μ M und 25 μ M getestet) zu einem Rückgang der Treg-Zellpopulation führt (vgl. Abb. 3.16). Bei einer Konzentration von 5 μ M C6-Ceramid ergab sich hierbei durchschnittlich eine Verringerung der Foxp3⁺ CD25⁺ / CD4⁺ T-Zellen von 4,21% auf 2,22% (Abnahme absolut: 1,99%; Abnahme relativ: 47,3%). Dieser Unterschied in der Treg-Zellfrequenz war bei den insgesamt drei untersuchten Spendern mit einem P-Wert von $<0,05$ in einem zweiseitigen Student's T-Test signifikant. Für 25 μ M C6-Ceramid ergaben sich ähnliche Ergebnisse.

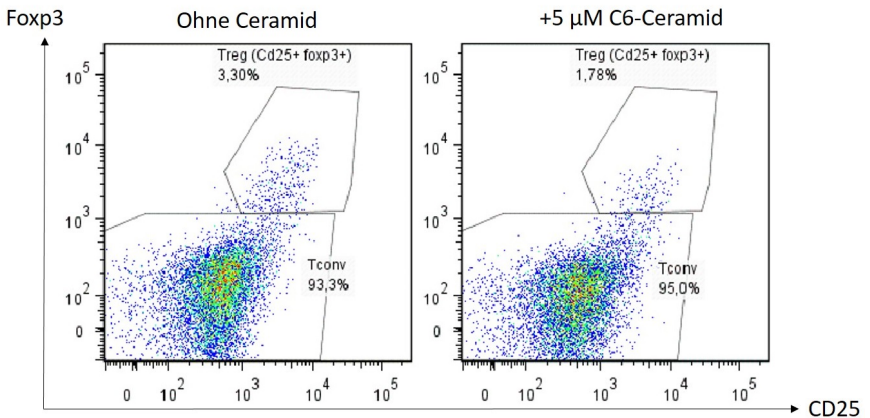


Abb. 3.16: Vergleich der Treg-Zellfrequenzen ohne und mit C6-Ceramid. PBMCs desselben Spenders wurden wie bereits beschrieben mit 0,1 μ g/ml α CD3-Antikörper kultiviert. Zusätzlich wurde bei einer Kultur C6-Ceramid hinzugegeben (Endkonzentration 5 μ M). Repräsentative, durchflusszytometrische Abbildung von insgesamt 3 Spendern.

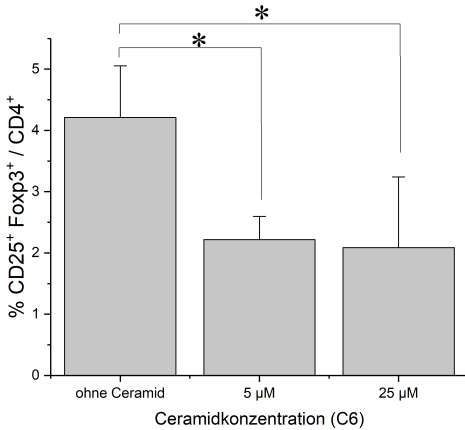


Abb. 3.17: Vergleich der Treg-Zellfrequenzen ohne und mit 5 bzw. 25 µM C6-Ceramid. * $p < 0,05$ in ANOVA-Test mit Tukey-Post-Hoc-Analyse $n=3$.

Da Ceramid als Signalmolekül in die Apoptosekaskade eingreift und diese aktivieren kann, konnten auch zytotoxische Auswirkungen auf die CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden. Dies zeigte sich an einer Abnahme der absoluten Zellzahlen an Treg- und Tconv-Zellen bei Kultivierung mit 5 µM C6-Ceramid (Abnahme absoluter Zellzahlen: für Treg-Zellen um 74,4%; für Tconv-Zellen um 49,3%), sodass die Verringerung der Treg-Zellfrequenz darauf beruht, dass der Rückgang regulatorischer T-Zellen stärker ausfällt als jener der konventionellen T-Zellen.

Ein ähnliches Bild, wenngleich auf niedrigerem Gesamtniveau, zeigte sich auch bei Kultivierung der PBMCs in Abwesenheit von αCD3-Antikörper (im Durchschnitt 0,246% Treg-Zellen ohne Ceramid; 0,150% Treg-Zellen bei 5 µM C6-Ceramid; absolute Abnahme um 0,096%, relative Abnahme um 39,0%), was darauf hinweist, dass dieser Effekt unabhängig von dem zugegebenen Antikörper ist. Die Verwendung einer noch größeren Menge an C6-Ceramid (Endkonzentration 25 µM) erbrachte ohne αCD3-Antikörper, eine weitere Verringerung des Anteils an regulatorischen T-Zellen auf durchschnittlich 0,092%.

Der Rückgang der Treg-Frequenz spiegelt sich, bezüglich der absoluten Zellzahlen, an einer Verringerung der Treg-Zellen um circa 76% wieder, wobei die Gegenwart von C6-Ceramid auch zu einer Verringerung der absoluten Tconv-Zellen auf etwa die Hälfte führte.

In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen, zusätzlich zum αCD3-Antikörper und C6-Ceramid in Anwesenheit von 0, 0,2, 1 und 5 µM Sertralin kultiviert. Hierdurch sollte überprüft werden, ob der zuvor beobachtete Effekt des Treg-Zellanstiegs durch externe Zufuhr von Ceramid beeinflusst werden kann. Es zeigte sich hierbei, dass die Zugabe von Sertralin sowohl ohne, als auch mit C6-Ceramid eine Vermehrung der regulatorischen T-Zellen auslösen kann. Das generelle Niveau war unter den

mit Ceramid behandelten Proben jedoch niedriger.

Bei drei untersuchten Spendern (2 davon Responder) zeigte sich bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ Sertralin durchschnittlich eine gegenüber dem Nullwert erhöhte Treg-Zellfrequenz. Ohne gleichzeitiges C6-Ceramid kam es zu einem Anstieg an regulatorischen T-Zellen von 3,51% auf 4,08%, während es in Anwesenheit von Ceramid zu einem Anstieg von 2,22% auf 3,59% kam. Diese Ergebnisse erreichten keine statistische Signifikanz.

3.6.2 Der kompetitive ASM-Inhibitor ARC39 nimmt keinen Einfluss auf die beobachteten Effekte

Um weiter zu untersuchen, inwieweit die durch die FIASMAS bedingte, funktionelle Inhibition der sauren Sphingomyelinase für die beobachteten Effekte auf Treg- und Tconv-Zellen verantwortlich ist, wurde in einem weiteren Experiment die Substanz ARC39 verwendet.

Dabei handelt es sich um einen direkten, kompetitiven Inhibitor der sauren Sphingomyelinase, der diese durch eine Bindung am katalytischen Zentrum blockiert. Durch diesen Wirkmechanismus, der sich somit grundsätzlich von dem der FIASMAS unterscheidet, kommt es zu einer sehr effizienten Blockade der ASM ($\text{EC}_{50}=0,51\ \mu\text{M}$ im fluorometrischen Enzym-Assay). Allerdings kann ARC39 bei Zugabe zu einer Zellkultur nur eingeschränkt in die Zelle gelangen, sodass es nur zu einer Hemmung der an der Oberfläche befindlichen ASM kommt, während die L-ASM weiterhin aktiv ist [104].

Im Gegensatz zu den FIASMAS, die bereits seit vielen Jahren zur experimentellen Blockade der ASM eingesetzt werden, handelt es sich bei ARC39 um eine noch relativ neue Substanz, die der Stoffklasse der Bisphosphonate zugeordnet werden kann (vgl. [105]). Da noch wenig über diesen Inhibitor bekannt ist, ist auch unklar, welchen Gesamteinfluss er auf den Sphingolipidmetabolismus nimmt.

Durch parallele Zugabe von ARC39 und Sertralin zu den Zellkulturen sollte überprüft werden, ob sich der zuvor beobachtete Treg-Zellanstieg auch nach einer mutmaßlich vollständigen Blockade der membranständigen ASM durch ARC39 reproduzieren lässt. Hintergrund dieser Überlegung ist, dass es eine entscheidende Rolle spielen könnte, welche Form der ASM bzw. in welchem zellulären Kompartiment die ASM inhibiert wird.

Eine Ablösung der ASM von der lysosomalen Membran durch die FIASMAS bedingt demnach eine grundsätzlich andere Wirkung, als eine direkte Hemmung des Enzyms an der Membranoberfläche.

Um weiter zu untersuchen, welche ASM-Form mit den beobachteten Effekten in Verbindung steht, wurden den Kulturen die schon zuvor verwendeten Mengen an Sertralin ($0\ \mu\text{M}$, $0,2\ \mu\text{M}$, $1\ \mu\text{M}$ und $5\ \mu\text{M}$) zusammen mit $5\ \mu\text{M}$

ARC39 (Konzentration, bei der eine vollständige ASM-Blockade besteht) zugeben.

Überraschenderweise zeigten sich in der durchflusszytometrischen Analyse durch die Addition von ARC39 keine Auswirkungen auf die Population der regulatorischen T-Zellen. Auch die Expression verschiedener zellulärer Marker (CD25, CD69, Foxp3, CTLA-4) wurde weder in Treg- noch in Tconv-Zellen durch diesen Inhibitor signifikant beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

Ebenfalls unverändert blieb das Ansprechen der Responder auf Sertralin in Form einer Erhöhung der Frequenz an regulatorischen T-Zellen. Bei insgesamt drei untersuchten Blutproben (zwei davon Responder) zeigte sich durchschnittlich eine Vermehrung des Treg-Zellanteils nach Zugabe von Sertralin, wobei dieser Effekt durch gleichzeitige Addition von ARC39 unverändert blieb.

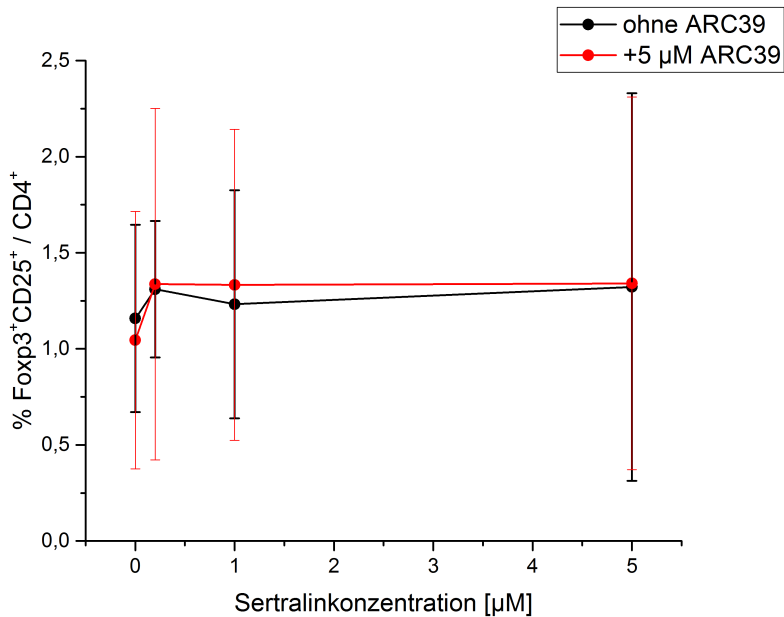


Abb. 3.18: % regulatorischer T-Zellen nach Zugabe von Sertralin mit und ohne ARC39. Aufgetragen sind die Werte für den Anteil an Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ T-Zellen an allen CD4⁺ T-Zellen. Die rote Linie zeigt die Situation in Anwesenheit von 5 µM ARC39 während die Messwerte der schwarzen Linie aus den Proben ohne ARC39 ermittelt wurden. Durchschnittlich Werte für insgesamt n=3 untersuchte Spender. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Auch in einem weiteren Zellkultorexperiment, bei dem mit αCD3 behan-

delten Proben lediglich ARC39 hinzugegeben wurde (analog zu vorherigen Experimenten mit Sertralin/Citalopram), konnten keine nennenswerten Auswirkungen auf die %Treg-Zellen oder die Expression verschiedener Oberflächenmarker beobachtet werden.

Demnach sieht es so aus, dass eine Auslösung der beschriebenen Effekte nicht durch den direkten ASM-Inhibitor ARC39 erlangt werden kann, sondern, dass eine Hemmung der lysosomalen ASM durch FIASMAS erforderlich ist.

3.7 Funktionelle Effekte der ASM-Inhibitoren auf Gedächtnis-T-Zellen

Um zu untersuchen, inwieweit die Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase auf die Funktion von aktivierten T-Zellen Einfluss nehmen, wurden in einem weiteren Experiment die Auswirkungen von Sertralin und Citalopram auf Gedächtnis-T-Zellen untersucht. Hierfür wurden humane PBMCs für einen Zeitraum von sechs Tagen (ohne vorherige HDK) mit Td (Tetanus-Diphtherie-Toxoid), beziehungsweise PPD (Purified Protein Derivate) kultiviert.

Dabei handelt es sich um sogenannte Recall-Antigene, gegen die in den meisten Individuen spezifische Gedächtnis-T-Zellen vorhanden sind. Tetanus-Diphtherie Toxoid etwa wird aufgrund der hohen Durchimpfungsrate für die entsprechenden bakteriellen Erreger vom Großteil der Bevölkerung durch spezifische T-Zellen erkannt. Auch für das PPD, welches beim Tuberkulin-Test zum Einsatz kommt, besitzen die meisten Menschen aufgrund der weiten Verbreitung von Mycobakterien Gedächtnis-T-Zellen mit spezifischen T-Zell-Rezeptoren.

Unter Einsatz dieser Antigene können so einzelne Gedächtnis-T-Zellen stimuliert werden, die daraufhin vermehrt proliferieren und als aktivierte Immunzellen Effektorfunktionen ausführen. Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, wie sich die Zugabe von Sertralin, beziehungsweise Citalopram auf diese Zellen auswirkt. Durch den Einsatz von CFSE wurde in der durchflusszytometrischen Analyse dabei der Anteil an proliferierenden $CD4^+$ T-Zellen bestimmt.

Die ASM-Inhibitoren Sertralin und Citalopram zeigten auf die mit Td stimulierte Immunzellen keine Einflussnahme hinsichtlich der Zellproliferation. In der statistischen Auswertung ergab sich allenfalls eine schwache, negative Korrelation zwischen Inhibitorkonzentration und dem Anteil an proliferierenden Zellen. Diese Korrelation erreichte allerdings auf einem Niveau von $p < 0,05$ keine statistische Signifikanz ($n=5$; Spearman-

Korrelation; für Sertralin: Korrelationskoeffizient=-0,085, p=0,72; für Citalopram: Korrelationskoeffizient=-0,36, p=0,12). Ein ähnliches Bild ergab sich auch für Immunzellen, die mit PPD stimuliert wurden (n=4; Spearman-Korrelation; für Sertralin: Korrelationskoeffizient=-0,05, p=0,86; für Citalopram: Korrelationskoeffizient=-0,29, p=0,27). Die Expressionsanalyse von CD25, CD69, Foxp3 und CTLA-4 durch die CD4⁺ T-Zellen zeigte ebenfalls keine Auffälligkeiten.

Darüber hinaus wurden in den Zellüberständen an Tag 6 der Kultur die Konzentrationen der Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IL-17A, IFN- γ und TNF bestimmt. Erwartungsgemäß führte die Aktivierung von Gedächtnis-T-Zellen durch Recall-Antigenen zu einer verstärkten Zytokinproduktion durch diese Zellen. Während Td insbesondere zu einer vermehrten Bildung von IL-4, IL-5 und IL-10 führte, induzierte PPD vornehmlich die IL-2-, TNF- und IFN- γ -Produktion (vgl. Abb. 3.19).

	IL-2 [pg/ml]	IL-4 [pg/ml]	IL-5 [pg/ml]	IL-10 [pg/ml]	IL-17A [pg/ml]	TNF [pg/ml]	IFN- γ [pg/ml]
unstimuliert	1,59	0,96	28,5	7,50	5,30	12,96	550,90
100 mU/ml Td	9,10	7,41	180,63	14,43	16,55	40,50	587,18
10 μ g/ml PPD	15,57	1,89	48,42	7,96	10,81	147,76	2256,65

Abb. 3.19: Zytokinkonzentrationen ohne und mit Stimulation durch Recall-Antigenen. Eingetragen sind die Mittelwerte Zytokinkonzentrationen, die im Zellüberstand an Tag 6 der Kultur gemessen wurden (n=7). Neben den unstimulierten Ansätzen erfolgte in anderen Proben eine Stimulation mit 100 mU/ml Td bzw. 10 μ g/ml PPD.

Bei dem mit Td stimulierten Ansatz konnte in den mit Sertralin kultivierten Proben eine verringerte Konzentration von Zytokinen im Zellüberstand festgestellt werden. Weiterhin konnten durch Vergleichsanalysen mit Proben verschiedener Mengen an Sertralin für einige der Zytokine eine negative Korrelation zwischen der Sertralinkonzentration und der Menge an gebildetem Zytokin aufgezeigt werden. Es wurde ein inhibitorischer Effekt auf die Bildung von TNF, IL-10 und IL-5 beobachtet, deren Bildung bei Verwendung großer Mengen an Sertralin (5 μ M) nahezu vollständig verhindert wurde (vgl. Abb.3.20). Für IL-2, IL-4 und IL-17A wurden insgesamt nur geringe Zytokinmengen im Zellüberstand beobachtet, die sich auch bei Zugabe von Sertralin nicht signifikant veränderten. Die Bildung von IFN- γ wurde durch Td nicht stimuliert.

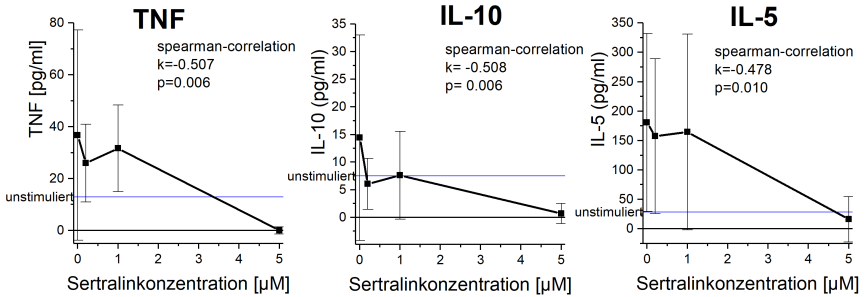


Abb. 3.20: Stimulation mit Td: Zytokinmenge nach Zugabe von Sertralin. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Zytokinmengen im Zellüberstand an Tag 6 der Kultur sowie die Fehlerbalken mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die blaue, horizontale Linie zeigt die Zytokinmenge in der Negativkontrolle ohne Stimulation mit Td und ohne Inhibitorzugabe. Für die einzelnen Zytokine sind weiterhin die Angaben zur Korrelation zwischen Sertralinkonzentration und Zytokinmenge angegeben. Korrelationskoeffizienten (k) für Spearman-Korrelation, sowie P-Wert für einen zweiseitigen Signifikanztest $n=7$.

Ähnliche Effekte konnten auch durch Kultivierung der Zellen mit Citalopram erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings waren dazu größere Inhibitormengen nötig, um die Zytokinproduktion vergleichbar stark zu senken wie mit Sertralin. Wenngleich nicht in jedem Fall signifikant, konnten Korrelationen zwischen der Citalopramkonzentration und der Zytokinmenge für TNF ($k=-0,58$; $p=0,001$), IL-10 ($k=-0,29$, $p=0,12$) und IL-5 ($k=-0,40$; $p=0,037$) beobachtet werden. Eine weitgehend vollständige Blockade der Zytokinproduktion wurde mit einer Konzentration von $40 \mu\text{M}$ Citalopram erreicht.

Sowohl für Sertralin, als auch für Citalopram ergab sich ein prinzipiell ähnliches Bild, wenn die Zellen mit PPD anstatt mit Td stimuliert wurden. Hierbei kam es zu negativen Auswirkungen auf die Bildung von $\text{IFN}\gamma$, TNF und IL-5. Durch Verwendung großer Mengen an Sertralin ($5 \mu\text{M}$) bzw. Citalopram ($40 \mu\text{M}$) konnte die Zytokinproduktion nahezu vollkommen unterbunden werden, wobei sich jedoch nicht in allen Fällen eine statistisch signifikante Korrelation ergab (vgl. Abb.3.21).

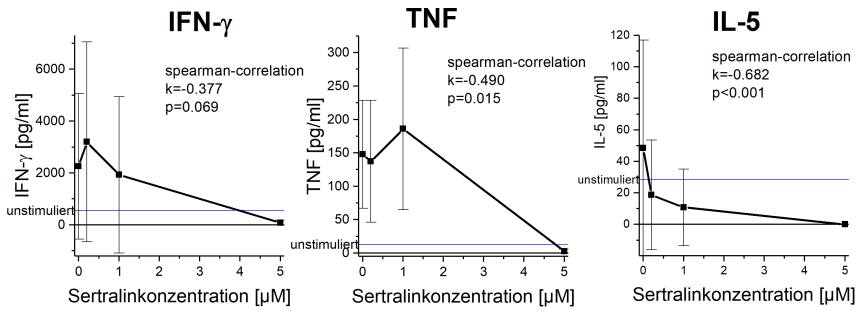


Abb. 3.21: Stimulation mit PPD: Zytokinmenge nach Zugabe von Sertralin. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Zytokinmengen im Zellüberstand an Tag 6 der Kultur, sowie die Fehlerbalken mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die blaue, horizontale Linie zeigt die Zytokinmenge in der Negativkontrolle ohne Stimulation mit PPD und ohne Inhibitorzugabe. Für die einzelnen Zytokine sind weiterhin die Angaben zur Korrelation zwischen Sertralinkonzentration und Zytokinmenge angegeben. Korrelationskoeffizienten (k) für Spearman-Korrelation, sowie P-Wert für einen zweiseitigen Signifikanztest $n=6$.

4. Diskussion

4.1 Hemmung der sauren Sphingomyelinase durch Antidepressiva

Wie bereits erläutert, hat die saure Sphingomyelinase als ein entscheidendes Enzym zur Generierung von Ceramid die Rolle einer zentralen Drehscheibe im Sphingolipidmetabolismus inne. Durch dieses Enzym werden indirekt auch komplexe Zellmechanismen, Membraneigenschaften und -funktionen, sowie intra- und interzelluläre Signalweiterleitungen reguliert.

4.1.1 Antidepressive Wirkung durch ASM-Inhibition

Vor diesem Hintergrund ist die Beobachtung, dass viele Vertreter aus der Arzneimittelklasse der Antidepressiva in der Lage sind, die ASM zu inhibieren interessant [74]. Entsprechend der Monoamin-Hypothese geht man heute davon aus, dass die Wirkungsweise von SSRIs auf der Inhibition der Serotonin-Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt beruht. Neuere Erkenntnisse weisen jedoch auf ein komplexeres Geschehen hin, durch welches die Antidepressiva wirken.

Die Hemmung der sauren Sphingomyelinase stellt dabei vermutlich eine zusätzliche Komponente der antidepressiven Wirkung dar [76]. Im Konkreten gibt es Hinweise auf eine gestörte Neubildung von Nervenzellen im Bereich des Hippocampus als Ursache einer Depression. Es wurde gezeigt, dass diese Störung durch antidepressive Medikamente effektiv behandelt werden kann [74], [130]. Die gestörte Neurogenese wiederum scheint durch erhöhte Konzentrationen von proapoptotisch wirksamen Ceramid in diesem Hirnareal bedingt zu sein.

Somit ist es denkbar, dass viele der eingesetzten Medikamente nicht ausschließlich durch eine Erhöhung der Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt, sondern auch durch eine Erniedrigung der Ceramidkonzentration in bestimmten Hirnbereichen wirken.

Dieses Beispiel macht deutlich, dass die vielseitige Einflussnahme dieser Medikamente, sowie die ebenfalls weitreichende Wirkung der ASM ein komplexes Wechselwirkungssystem bedingen, in dem sich verschiedene Effekte überlagern. Diese Tatsache gestaltet die Forschung in diesem Bereich als schwierig und erfordert die übergeordnete Betrachtung mehrerer Komponenten in ihrem Zusammenhang.

Wenngleich Antidepressiva wie Desipramin und Amitriptylin neben der ASM-Inhibition noch verschiedene weitere Wirkungen ausüben, wurde der Großteil der Forschung zur sauren Sphingomyelinase unter Verwendung dieser Substanzen durchgeführt. In Ermangelung eines spezifischen Hemmstoffs der ASM wurden daher für die hier durchgeführten Experimente die SSRIs Sertralin und Citalopram verwendet.

4.1.2 ASM-Hemmung durch Sertralin und Citalopram

Beide selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer werden bereits seit Langem in der klinischen Behandlung von Depressionen und anderen psychiatrischen Erkrankungen eingesetzt. Sertralin und Citalopram, sowie dessen Enantiomer Escitalopram weisen dabei vergleichbare Kinetiken auf und werden auch in vergleichbar hoher Dosierung angewendet [131], [132]. Dies spricht dafür, dass beide Substanzen insgesamt auch vergleichbar stark auf den menschlichen Körper wirksam sind.

In dem durchgeführten Fluoreszenz-Enzym-Assay konnten jedoch deutliche Unterschiede in der inhibitorischen Potenz der ASM zwischen Sertralin und Citalopram gemessen werden, was bereits in anderen Experimenten früherer Forschungsgruppen gezeigt werden konnte. Sowohl im Maus- als auch im Mensch-Modell beobachteten wir für Citalopram, mit EC50-Werten, die über dem Zehnfachen des Wertes für Sertralin lagen, eine schwächere inhibitorische Potenz.

Darüber hinaus sind die Unterschiede bezüglich der ASM-Hemmung zwischen Sertralin und Citalopram insbesondere im niedrigen Konzentrationsbereich der beiden Substanzen zwischen ca. 0,5 und 10 μM erkennbar (Abb.3.5). Bemerkenswert ist dies auch in Anbetracht der Tatsache, dass dies auch in etwa dem Konzentrationsbereich entspricht, in welchem Sertralin und Citalopram im Plasma bzw. in verschiedenen Geweben des Körpers bei Patienten mit entsprechender Medikation vorliegen [133], [134].

Als Konsequenz aus dieser Beobachtung standen uns somit ein starker und eine schwacher ASM-Inhibitor zur Verfügung, sodass wir unterschiedlich starke experimentelle Effekte auf die unterschiedliche ASM-Inhibition der beiden Substanzen zurückführen. Wenngleich keine weiteren offenkundigen Unterschiede zwischen Sertralin und Citalopram bestehen, ist allerdings nicht auszuschließen, dass zusätzliche Nebenwirkungen der Substanzen die experimentellen Beobachtungen mit beeinflussen. Außerdem betrifft der In-

hibitionsmechanismus (FIASMA), wie erwähnt, neben der sauren Sphingomyelinase auch andere Enzyme. Eine vollkommen spezifische und selektive ASM-Inhibition würde daher ein unkomplizierteres und verbessertes Vorgehen darstellen, ist jedoch experimentell nicht durchführbar. Dennoch ist der Einsatz von Sertralin und Citalopram unserer Einschätzung nach eine adäquate Methode, um die Effekte einer ASM-Inhibition zu untersuchen.

4.2 Treg-Zellaktivierung durch ASM-Inhibition in der Maus

Ein Zusammenhang zwischen einer Hemmung der sauren Sphingomyelinase und einer Vermehrung von regulatorischen T-Zellen konnte für das Mausmodell bereits in früherer Forschung erkannt werden [124], [125]. Zu beachten ist hierbei primär die Beobachtung, dass die Population der CD4⁺ T-Zellen in ASM-Knock-out-Mäusen zu einem Großteil aus Foxp3⁺ CD25⁺ regulatorischen T-Zellen besteht. Im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen wurde darüber hinaus eine vermehrte Expression von CTLA-4 und eine verstärkte suppressive Aktivität festgestellt.

Die in-vitro-Kultivierung von Nicht-Knock-out-Mauszellen mit dem ASM-Inhibitor Amitriptylin bei gleichzeitiger Zugabe von IL-2 ergab ähnliche Effekte in Form einer Vergrößerung des Anteils an regulatorischen T-Zellen. In Analogie hierzu konnten wir in unseren Experimenten mit Sertralin und Citalopram eine relative Vermehrung der Treg-Zellen messen. Dieser Effekt trat durch Zugabe des starken ASM-Inhibitor Sertralin schon bei geringen Konzentration auf, während große Mengen an Citalopram für vergleichbare Wirkungen nötig waren (vgl. hierzu auch Abb.3.1 und Abb.3.3).

Die Tatsache, dass sich Unterschiede in der Potenz der ASM-Inhibition auch in einer unterschiedlichen Effektstärke niederschlagen, spricht dafür, dass dieser Treg-Zellanstieg auch tatsächlich durch eine Hemmung der sauren Sphingomyelinase bedingt ist.

Mechanistisch konnten wir zeigen, dass diese relative Treg-Zellvermehrung im Mausmodell in einem absoluten Rückgang an konventionellen T-Zellen bei gleichzeitiger Konstanz der Treg-Zellen begründet ist (vgl. Abb.3.4).

Insofern kommt es primär zu einer hemmenden Wirkung auf die konventionellen T-Zellen, von welcher die Treg-Zellen weitgehend unberührt bleiben. IL-2 stellt dabei einen entscheidenden Faktor dar, durch welchen die regulatorischen T-Zellen von den negativen Effekten der Inhibitoren geschützt bleiben.

Zumal derartige Beobachtungen jedoch auch für die Effekte auf das Immunsystem in vivo bestätigt werden können [125], ist davon auszugehen, dass dieser bloße relative Treg-Zellanstieg Auswirkungen im Sinne einer Immun-

suppression bedingt.

Aktivität und Wirkrichtung der Immunzellen sind somit als Teil eines fein regulierten Immunsystems zu verstehen, das sich durch ein Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Zellpopulationen auszeichnet. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten der Treg-Zellen durch eine Verminderung der Tconv-Zellen bewirkt daher insgesamt eine überwiegend supprimierende Modulation des Immunsystems.

4.3 Modulation menschlicher Immunzellen

Die Untersuchung der im Mausmodell beobachteten Effekte im menschlichen System stellt in mehrerer Hinsicht eine Herausforderung dar, welche eine unmittelbare Übertragung der Experimente auf den Menschen erschweren. Um einen möglichst analogen und praktisch durchführbaren experimentellen Aufbau zu erstellen, wurde auf eine in-vitro-Kultivierung von Immunzellen aus menschlichen Blutproben zurückgegriffen. Dabei ist zu beachten, dass die verwendeten Proben (anonyme Blutproben aus der Transfusionsmedizinischen Abteilung des Universitätsklinikums Würzburg) mutmaßlich aus einer heterogenen Gruppe verschiedener Menschen stammen.

Weiterhin wurde mit Hilfe der "Hohen Dichte Kultur" versucht, gewebsartige Immunzellen zu generieren, während für die Mausexperimente Milzgewebe verwendet werden konnte.

4.3.1 Erhöhung der Treg-Zellfrequenz durch ASM-Inhibition ohne zusätzliche Stimulantien

Wir konnten beobachten, dass eine Kultivierung humaner PBMCs zusammen mit den ASM-Inhibitoren Sertralin bzw. Citalopram zu einer Steigerung des Anteils $CD25^+$ $Foxp3^+$ Treg-Zellen an $CD4^+$ T-Zellen führt (vgl. Abb.3.7). Dies deutet darauf hin, dass sich der im Mausmodell gezeigte Effekt einer relativen Treg-Zellerhöhung und damit zusammenhängender Immunsuppression auch im Menschen anwenden lässt.

Es ist allerdings zu beachten, dass die Auswirkungen der ASM-Inhibitoren in den Humanexperimenten schwächer ausfielen als im entsprechenden Mausexperiment.

Da die Erhöhung der Treg-Zellfrequenz bereits in den unstimulierten Kulturen humaner Zellen beobachtet werden konnte, ist anzunehmen, dass ein entsprechender Effekt auch in vivo stattfinden könnte und, dass dieser im Wesentlichen auf eine Blockierung der sauren Sphingomyelinase zurückzuführen ist.

Dafür spricht auch, dass die Proben mit 1 μM Sertralin zu einer deutlichen (+82%) und statistisch signifikanten Zunahme an Treg-Zellen führten, während die gleiche Menge des schwachen ASM-Inhibitors Citalopram nur einen geringfügigen (+32%), nicht signifikanten Anstieg bedingte.

Durch die Ermittlung der absoluten Zellzahlen konnten wir erkennen, dass dies durch eine Vermehrung der Treg-Zellpopulation bei gleichzeitiger Verringerung der Tconv-Zellpopulation bedingt wurde. Gleichzeitig wurden bei den verwendeten Konzentrationen keine nennenswerten zytotoxischen Inhibitorwirkungen beobachtet (Ausnahme: 5 μM Sertralin, hier allerdings auch keine Treg-Zellvermehrung).

Demgegenüber stehen die Ergebnisse aus dem Mausexperiment, bei dem sich eine zunehmende Zytotoxizität mit ansteigender Inhibitorkonzentration zeigte, was dabei den Mechanismus für die erhöhte Treg-Zellfrequenz darstellt.

4.3.2 ASM-Inhibition bei gleichzeitiger Stimulation der Immunzellen

Wenngleich sich in den *in vitro* Kulturen bereits ohne Zugabe von zellstimulierenden Molekülen signifikante, jedoch aus absoluter Sicht nur sehr schwache Effekte beobachten ließen, wurden für die weiteren Experimente stimulierte Ansätze verwendet. Auch vor dem Hintergrund dessen, dass sich im Mausmodell bestimmte Wirkungen auf regulatorische T-Zellen erst nach Stimulation mit IL-2 beobachten lassen (vgl. [125]), wurden die Wirkungen der ASM-Inhibitoren daher in verschiedenen experimentellen Versuchsanordnungen untersucht.

Stimulation mit IL-2

Nach Zugabe von IL-2 zu den *in vitro* Kulturen konnten wir keine Auswirkungen der ASM-Inhibitoren auf das Expressionsverhalten oder die mengenmäßige Verteilung der T-Zellen auf Treg- und Tconv-Zellen erkennen. Interessant ist dies in Anbetracht der Tatsache, dass dieses Zytokin durch Bindung an den IL-2-Rezeptor (CD25= α -Kette) essentiell für die Proliferation von regulatorischen T-Zellen ist [11] und es für die Treg-Zellen im Mausmodell ein Überlebenssignal gegen die Zytotoxizität der ASM-Inhibitoren darstellt.

Dass sich dies jedoch nicht unmittelbar auf den Menschen übertragen zu lassen scheint, spricht dafür, dass den beobachteten Effekten zumindest im Menschen ein komplexerer Wirkmechanismus zu Grunde liegt.

α CD28-Kostimulation

Da die Stimulation über das kostimulatorische Molekül CD28 ganz entscheidende Bedeutung für die Differenzierung und Aktivierung von regulatorischen T-Zellen besitzt [16], [17], untersuchten wir weiter, wie sich eine Stimulation der Zellen mit einem α CD28-Antikörper auf das Zellkulturexperiment mit den ASM-Inhibitoren auswirkt.

Dabei ist zu beachten, dass eine Stimulation über CD28 eine verstärkte Aktivierung der sauren Sphingomyelinase induziert und die ASM gleichzeitig zentrale Wirkungen des CD28-Signalwegs vermittelt [135]. Weiterhin führt eine pharmakologische Hemmung der ASM durch Imipramin auch zu einer Blockade CD3/CD28-abhängiger Signalkaskaden in CD4⁺ T-Zellen [117], [118].

Interessanterweise konnten wir jedoch keinen Einfluss einer α CD28-Kostimulation auf die Effekte einer durch ASM-Inhibition bedingten Treg-Vermehrung beobachten (vgl. Abb.3.14).

α CD3-Stimulation

Während wir somit weder nach Stimulation des IL-2-Rezeptors noch des CD28-Rezeptors wesentliche Wirkungen einer ASM-Inhibition auf Tconv- und Treg-Zellen beobachten konnten, lies sich nach Stimulation der Kulturen mit Hilfe eines α CD3-Antikörpers eine Vermehrung der Treg-Zellfrequenz durch Zugabe von Sertralin erkennen.

Jedoch nur bei einem Teil der Blutspender (9 von 18) war eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Treg-Zellfrequenz messbar, während sich bei den anderen Spendern keine eindeutige Tendenz erkennen ließ.

Da sich unter Stimulation von CD3 deutliche Effekte der ASM auf die T-Zellen beobachten und beurteilen lassen, stellt dieser experimentelle Aufbau nach unserer Ansicht ein geeignetes Mittel dar, um die Bedeutung der ASM für Tconv- und Treg-Zellen zu untersuchen.

Abhängigkeit der Effekte vom experimentellen Aufbau

Wenngleich unsere Beobachtungen darauf hinweisen, dass die im Mausmodell beobachteten, ASM-abhängigen Effekte sich in anderer Form auch im humanen System darstellen, fällt es schwer, diese hier isoliert und eindeutig darzustellen. Weiterhin scheint es offensichtlich, dass die Effektpräsentation in den stimulierten Ansätzen entscheidend auch von dem stimulierenden Agens abhängt.

Die mutmaßliche Ursache hierfür ist, dass die ASM selbst einen entscheidenden Beitrag dieser Stimulation von CD4⁺ T-Zellen vermittelt. Obwohl die genaue Rolle der ASM für die T-Zell-Aktivierung unklar ist, so ist sie

dennoch für verschiedene Aktivierungswege, unter anderem auch den CD28-Signalweg, von Bedeutung [117], [118], [135].

Unklar ist, inwieweit die ASM im CD3-Signalweg eingebunden ist: Während es Hinweise darauf gibt, dass die ASM eine TNF-vermittelte Hemmung von CD3 und von Ca^{2+} -Kanälen auslöst [114], scheint sie andererseits neben CD28- auch CD3-Signale zu vermitteln (vgl. [117] und [118]). In jedem Fall sind die Signalwege über CD3 und CD28 auch nicht unabhängig voneinander und sollten daher immer auch zusammenfassend betrachtet werden.

Bei Stimulation unserer Zellkulturen mit einem αCD28 -Antikörper kam es zu keinen nennenswerten ASM-Auswirkungen. Diesen Beobachtungen könnte womöglich zu Grunde liegen, dass die ASM-Effekte, insbesondere in Form einer Aktivierung und Vermehrung von Treg-Zellen wesentlich über CD28 vermittelt werden und dementsprechend ausbleiben, wenn eine externe Stimulation dieses Signalwegs erfolgt.

Insgesamt unterstreichen unsere Ergebnisse damit die besondere Bedeutung der sauren Sphingomyelinase für CD3- und CD28-vermittelte Zellsignale (vgl. [135]). Letztlich ist die genaue Rolle der ASM jedoch noch ungeklärt, sodass derzeit keine gesicherten Aussagen hierzu möglich sind (vgl. auch [120]).

4.3.3 Modulation αCD3 -aktivierter T-Zellen durch ASM-Inhibition

Aufbauend auf den verschiedenen Stimulationsexperimenten der in-vitro-Kulturen identifizierten wir schließlich einen mit αCD3 -Antikörper stimulierten Ansatz als geeigneten Versuchsaufbau um die ASM in humanen T-Zellen weiter zu untersuchen. In diesem Ansatz traten differenziert zu betrachtende, immunmodulatorische Wirkungen auf, die nun näher diskutiert werden sollen.

Vermehrung der Treg-Zellpopulation bei Respondern

Bemerkenswert ist, dass sich bei einigen Blutspendern, ähnlich zu den Experimenten in der Maus, eine dosisabhängige und weitgehend stetige Zunahme des Anteils an CD25^+ Foxp3^+ Treg-Zellen bei Behandlung der Zellkulturen mit dem ASM-Inhibitor Sertralin beobachten lässt (vgl. Abb.3.9). Interessant ist dabei, dass dies nicht bei allen Spendern auftritt. Diese Tatsache veranlasste uns dazu, eine entsprechende Einteilung der Blutspender in "Responder" und "Non-Responder" durchzuführen.

Fraglich ist, welche Ursache einer "Response" des Treg-Zellanstiegs zu Grunde liegt.

Es ist zu beachten, dass wir zwar hauptsächlich für Sertralin Responder (9 von 18) identifizieren konnten, dass aber auch bei Citalopram 4 von

18 Responder beobachtet wurden. Bemerkenswert ist dabei, dass alle 4 Responder für Citalopram auch Responder für Sertralin waren. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die ASM entscheidend darin involviert ist, ob eine Response auftritt oder nicht, sodass bei schwacher ASM-Hemmung (Citalopram) nur wenige Spender reagieren, während bei starker ASM-Hemmung (Sertralin) deutlich mehr Spender eine Vermehrung der Treg-Zellen aufweisen.

Derzeit kann nur spekuliert werden, welche Ursachen für eine Response eines Blutspenders verantwortlich sind. Denkbar wären beispielsweise genetische Unterschiede, die einen Einfluss auf das Signalnetzwerke von ASM, Sphingolipiden, CD3/CD28 und die Aktivierung von T-Zellen nehmen. Plausibel wäre auch, dass auf zellulärer Ebene individuell eine unterschiedlich starke Restaktivität der ASM nach Zugabe der Inhibitoren besteht. Möglicherweise stellen aber auch Verhalten, Umwelt, Alter, Geschlecht, immunologische Vorgeschichte oder andere Einflüsse entscheidende Faktoren dar.

Abhängigkeit des Treg-Zellanstieg von der Präsenz bereits vorhandener Treg-Zellen

Wie wir in einem weiteren Experiment zeigen konnten, funktioniert eine Response in Form einer Vermehrung von regulatorischen T-Zellen nur, wenn in den behandelten Zellkulturen auch zuvor Treg-Zellen vorhanden sind. Unter Verwendung eines durchflusszytometrischen Zellsortierers konnte nachgewiesen werden, dass es nach vorheriger Depletion von $CD4^+CD25^{hi}$ Treg-Zellen zu keiner Vermehrung von Treg-Zellen in Respondern mehr kommt (vgl. Abb.3.5).

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass eine Inhibition der ASM spezifische Auswirkungen auf regulatorische T-Zellen hat, die in den Tconv-Zellen nicht auftritt, oder sich aber anders präsentiert. Gleichzeitig sind die Effekte der ASM-Inhibition von dem Vorhandensein regulatorischer T-Zellen abhängig. In diesem Zusammenhang ist auch zu berücksichtigen, dass wir in den Treg-Zellen eine höhere Basisaktivität der sauren Sphingomyelinase messen konnten (vgl. Abb.3.6).

Vielleitige Veränderungen des Expressionsverhaltens in Treg- und Tconv-Zellen

Neben der Vermehrung des Treg-Zellanteils an $CD4^+$ T-Zellen, konnten wir Veränderungen im Expressionsverhalten der regulatorischen T-Zellen nach Behandlung mit den ASM-Inhibitoren feststellen. Überraschenderweise wurde dabei ein signifikanter Rückgang der CTLA-4-Expression in Treg-Zellen

gemessen (vgl. Abb.3.12 und Abb.3.13). Zu erwähnen ist auch, dass dies in gleicher Weise bei Respondern und Non-Respondern auftrat.

Aus mehreren Gründen sind diese Beobachtungen von Bedeutung: Primär vermitteln die Treg-Zellen durch Expression von CTLA-4 inhibitorische Signale gegenüber aktivierten T-Zellen und bewirken darüber eine Suppression des Immunsystems. Wie bereits erwähnt, werden die Effekte von CTLA-4 durch Bindung an CD80/86 verursacht und sind der Wirkung von CD28 an diesem Rezeptor entgegengesetzt.

Eine andere Forschungsgruppe konnte experimentell zeigen, dass die Verwendung eines CTLA-4-Antikörpers in Krebspatienten die Vermehrung von immunsuppressiv wirksamen Foxp3⁺ Treg-Zellen auslöst [136]. Gleichzeitig wurde hierbei aber auch eine Vermehrung an CD25⁺ CD69⁺ Effektor-T-Zellen beobachtet. In ähnlicher Weise konnten wir in den mit Sertralin behandelten Proben eine MFI-Erhöhung für CD25 in den Tconv-Zellen, nicht jedoch in den Treg-Zellen beobachten (Daten nicht gezeigt).

Komplexe immunmodulatorische Gesamtwirkung der ASM-Inhibitoren

Zusammenfassend sind unsere Ergebnisse so zu interpretieren, dass eine Behandlung von α CD3-stimulierten Kulturen mit ASM-Inhibitoren eine facettenreiche Gesamtwirkung auf die Population der T-Zellen ausübt: Zum einen erfolgt bei bestimmten Individuen eine Vermehrung von regulatorischen T-Zellen. Zum anderen wird die Population der CTLA-4^{hi} Treg-Zellen verringert, weswegen sich die Frage nach den Funktionen der Effektorwirkungen dieser Zellen stellt.

Insgesamt stimmen unsere Messungen mit den Ergebnissen aus der erwähnten in-vivo-Studie zur Untersuchung von CTLA-4-Antikörpern überein [136]. Interessant ist in der Gesamtbetrachtung dabei die Frage danach, welche Bedeutung CTLA-4 und CD28 besitzen und wie die ASM involviert ist. Unklar bleibt, ob die verringerte Expression von CTLA-4 in den Treg-Zellen Folge oder möglicherweise sogar Ursache der Treg-Zellvermehrung in den Respondern ist.

Zumal CTLA-4 funktionell gegenläufig zu CD28 wirkt und den nachgeschalteten Signalweg blockiert, könnte eine Herunterregulierung von CTLA-4 auch mit einer verstärkten Aktivierung dieser Signale, in welchen die ASM involviert ist, einhergehen. Demnach wäre eine Vermehrung von CTLA-4^{low} Treg-Zellen bei gleichzeitiger Aktivierung der Tconv-Zellen denkbar.

4.3.4 Untersuchung von Ceramid und ASM

Die Bildung von Ceramid ist die katalytische Aufgabe der ASM, wobei unklar ist, welche genaue Bedeutung auf das Immunsystem durch die Bereit-

stellung dieses bioaktiven Sphingolipids gewährleistet wird. Zu beachten ist dabei, dass es sich bei dem Sphingolipidmetabolismus um ein fein reguliertes Stoffwechselnetzwerk handelt (vgl. Abb.1.2), und dass die ASM in verschiedenen zellulären Lokalisationen unterschiedlich auftritt (vgl. Abb.1.3).

Verminderte Treg-Zellfrequenz in Anwesenheit von C6-Ceramid

Zur näheren Untersuchung der Bedeutung von Ceramid führten wir daher weitere Zellkulturexperimente mit externer Zugabe von C6-Ceramid durch. Dabei handelt es sich um eine kurzkettige Ceramidform, die dadurch von den Zellen aus der Umgebung aufgenommen werden kann.

Wir konnten feststellen, dass die Zugabe von C6-Ceramid zu den Kulturen zu einer signifikanten Verringerung des Anteils an CD25⁺Foxp3⁺ Treg-Zellen führte (vgl. Abb.3.16 und Abb.3.17). Dieses Ergebnis bestätigt entsprechende Beobachtungen, die kürzlich im Mausmodell gemacht wurden, für das humane System (vgl.[124]).

Es konnte gezeigt werden, dass C6-Ceramid zu einer Reduktion der iTreg-Zellpopulation in Wildtyp und ASM-KO-Mäusen führt. In früheren Untersuchungen hingegen wurde beobachtet, dass C6-Ceramid zusammen mit TGF- β eine verstärkte Expression von Foxp3 und damit Treg-Zelldifferenzierung in Mäusen bewirkt [137]. Folglich ist anzunehmen, dass Ceramid in jedem Fall Einfluss auf die Vermehrung und Entwicklung von regulatorischen T-Zellen nimmt, dass den Signalwegen gleichzeitig aber ein sehr komplexer Mechanismus zugrunde liegt.

Unsere Beobachtung im humanen System deuten darauf hin, dass die durch ASM-Inhibitoren verursachte Vermehrung von regulatorischen T-Zellen über die saure Sphingomyelinase von Ceramid abhängig ist. Dementsprechend führt eine pharmakologische Blockade der ASM mit damit zusammenhängender Ceramidverringerung zu einer Treg-Zellvermehrung, während im Umkehrschluss die Erhöhung der Ceramidmenge zur Treg-Zellverringerung führt. Insofern scheint sich die Menge an Ceramid gegenläufig zur Menge an regulatorischen T-Zellen zu verhalten, ohne dass wir dabei bisher die Ursache hierfür kennen.

Unklar ist, an welcher zellulären Lokalisation das Ceramid für die Wirkung auf die T-Zellen angreift. Vor dem Hintergrund, dass die ASM-Inhibitoren als FIASMAAs im lysosomalen Kompartiment die ASM blockieren, ist anzunehmen, dass das Ceramid somit membranassoziiert am Lysosom oder dem Zytoplasma agiert. Unbekannt ist allerdings, an welcher Stelle extern zugegebenes C6-Ceramid nach der Aufnahme in die Zelle wirkt. Da die Ausstattung mit Messenger-Molekülen und Signalproteinen entscheidend vom Ort innerhalb der Zelle abhängt, ist anzunehmen, dass dies auch für die ceramidabhängige Signalvermittlung von Bedeutung ist.

Fehlender Einfluss von Ceramid auf ASM-abhängige Treg-Zellvermehrung

Bei gleichzeitiger Zugabe von C6-Ceramid und den ASM-Inhibitoren Sertralin bzw. Citalopram zeigte sich, dass unabhängig von der Anwesenheit von C6-Ceramid eine Erhöhung der Treg-Zellfrequenz bei Zugabe der ASM-Inhibitoren auftrat. Es ist allerdings zu beachten, dass die Menge der regulatorischen T-Zellen in Gegenwart von C6-Ceramid insgesamt niedriger war. Wie wir feststellten, konnte eine Abnahme der Treg-Zellfrequenz von 3,51% auf 2,22% nach Zugabe von C6-Ceramid (5 μM) durch gleichzeitige Zugabe von Sertralin (1 μM) aufgehoben werden (Treg-Zellfrequenz 3,59%). Diese Messungen belegen, dass bei externer Zufuhr auch großer Mengen an Ceramid (höchste getestete Konzentration von 25 μM) eine prinzipielle Response in Form eines Treg-Zellanstiegs durch ASM-Inhibitoren möglich ist.

Dennoch sind diese "Response" und andere Effekte der ASM-Inhibitoren damit nicht unabhängig von Ceramid zu sehen, zumal C6-Ceramid selbst einen entsprechenden Effekt auslöst und die Bildung von Ceramid aus Sphingomyelin die katalytische Funktion der ASM darstellt. Allerdings deuten unsere Ergebnisse auch an, dass die Wirkungen der sauren Sphingomyelinase auf T-Zellen nicht durch die alleinige Bildung von Ceramid zum Ausdruck kommen, sondern diese vielmehr im Gesamtkontext des Sphingolipidmetabolismus und der nachgeschalteten Signalwege beurteilt werden müssen.

Fehlender Einfluss des direkten ASM-Inhibitors ARC39 auf die Effekte von Sertralin bzw. Citalopram

Wie wir weiterhin zeigen konnten, hat eine zusätzliche Blockade durch den ASM-Inhibitor ARC39 keine Auswirkungen auf die sertralinabhängige Vermehrung der regulatorischen T-Zellen (vgl. Abb.3.18). Hintergrund dieses Experimentes war die Überlegung, dass weniger die lysosomale, sondern vielmehr die membranständige Form der ASM durch Einflussnahme auf die Zusammensetzung der Plasmamembran für die beobachteten Effekte verantwortlich sein könnte. Zumal die L-ASM jedoch auch an die Membranoberfläche gelangen kann, sollte überprüft werden, welche Konsequenz eine direkte Hemmung der membranständigen ASM durch ARC39 auf die beobachteten Effekte hat (vgl. auch [104]).

Interessanterweise konnte aber weder bezüglich der Treg-Zellfrequenz, noch bezüglich des Expressionsverhaltens der T-Zellen eine durch ARC39 bedingte Veränderung beobachtet werden. Gleichzeitig zeigte auch die alleinige Zugabe von ARC39 keinen Effekt.

Anders als Sertralin und Citalopram handelt es sich bei ARC39 nicht um einen SSRI, sondern um eine Substanz, welche der Wirkstoffklasse der Bisphosphonate zugeordnet werden kann. Bisphosphonate (Leitsubstanz: Alen-

dronat) werden klinisch seit Langem in der Osteoporosetherapie eingesetzt. Es handelt sich damit um eine völlig andere Substanzklasse, welche auch einen anderen Inhibitionsmechanismus der ASM aufweist.

Wir konnten zwar mithilfe des fluorometrischen Enzymassays nachweisen, dass ARC39 die ASM prinzipiell blockieren kann, jedoch ist unklar, welche genaue Folge sich hieraus für den Einfluss von ARC39 auf den Sphingolipid-metabolismus in lebenden Zellen ergeben.

In Anbetracht der Tatsache, dass ARC39 scheinbar keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die zuvor unter ASM-Blockade beobachteten Effekte zu haben scheint, gehen wir davon aus, dass diese vornehmlich auf einer Blockade der lysosomalen ASM durch FIASMA's beruhen. Die membranständige Form, an der ARC39 angreift, scheint von untergeordneter Bedeutung zu sein.

4.3.5 Auswirkungen der ASM-Inhibitoren auf die Effektorfunktionen von Gedächtnis-T-Zellen

Gedächtnis-T-Zellen, die nach einer erstmaligen Antigenexposition spezifisch gegen ein bestimmtes Antigen ausgebildet werden, bilden die Grundlage des adaptiven Immunsystems, das im Laufe des Lebens eine langfristige Immunität gegen verschiedene Pathogene ausbildet. Nach erneuter Exposition zu einem entsprechenden Antigen, kann so sehr viel schneller und gezielter eine adäquate Immunreaktion ausgelöst werden.

Gedächtnis-T-Zellen können aber auch reaktiv gegen Autoantigene gebildet sein. Derartige Zellen sind für die Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankheiten von Bedeutung [138]. Da die Gedächtnis-T-Zellen das Immunsystem durch die Sekretion bestimmter Zytokine beeinflussen, untersuchten wir in einem weiteren Zellkulturexperiment, wie sich die Behandlung von stimulierten Gedächtnis-T-Zellen mit den ASM-Inhibitoren auf deren Proliferation und Zytokinproduktion auswirkt.

Zytokinhemmung in Immunzellen durch die ASM-Inhibitoren

Durch die Zugabe von sogenannten Recall-Antigenen, wie beispielsweise Td oder PPD, können in den Zellkulturen ruhende Gedächtnis-T-Zellen, die spezifisch gegen das entsprechende Antigen gerichtet sind (Tetanus-Diphtherie-Toxoid bzw. PPD, Tuberkulintest) reaktiviert werden. Dies zeigt sich auch an einer vermehrten Sekretion entsprechender Zytokine (vgl. Abb.3.19).

Wie wir zeigen konnten, führt die Anwesenheit der von uns untersuchten ASM-Inhibitoren, insbesondere Sertralin, zu einer Verminderung der gemessenen Zytokinmenge im Zellüberstand. Für einige Zytokine ergab sich dadurch eine signifikante, negative Korrelation zwischen der Konzentration des Inhibitors und Zytokinmenge (vgl. Abb.3.20 und Abb.3.21).

Hierzu zählten auch die beiden proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF. Bemerkenswerterweise konnte bereits in Experimenten mit humanen Zelllinien gezeigt werden, dass Sertralin die Sekretion von TNF aus T-Zellen blockiert [139]. Die Freisetzung der proinflammatorischen Gewebshormone führt physiologischerweise zu lokalen Entzündungsreaktionen, stellt aber auch einen entscheidenden Faktor bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen dar. Dementsprechend kann eine gerichtete Inhibition dieser Zytokine auch therapeutisch eingesetzt werden [140], [141].

Auch die Bildung von IL-5, ein Zytokin, das vorwiegend von TH2-Zellen gebildet wird und stimulierend auf die Aktivität von B-Zellen und Eosinophilen Granulozyten wirkt [1], konnte in unserem Experiment durch den Einsatz der ASM-Inhibitoren Sertralin und Citalopram blockiert werden.

Darüber hinaus konnten wir auch eine gewisse Hemmung der Sekretion von IL-10 in den Zellkulturen beobachten, wenngleich insgesamt nur geringe Mengen dieses Zytokins vorhanden waren. Interessant ist dies, da es sich bei IL-10 um ein überwiegend antiinflammatorisch wirksames Zytokin handelt, das die Aktivierung von TH1-Zellen und Makrophagen blockiert. Dies deutet darauf hin, dass sich der zytokinhemmende Effekt der ASM-Inhibitoren nicht allein auf entzündungsfördernde Gewebshormone beschränkt, sondern auch gewisse antiinflammatorische Effektorfunktionen betroffen sind. Wir konnten keine Auswirkungen der ASM-Inhibitoren auf die Konzentration von IL-2, IL-17A und IL-4 beobachten, wobei die Konzentrationen dieser Moleküle in den Experimenten grundsätzlich sehr niedrig waren. Insgesamt ist von einer komplexen Gesamtwirkung der ASM-Inhibitoren auf die Zytokinsekretion der Immunzellen auszugehen, die dementsprechend differenziert betrachtet werden muss.

Zusammenhang zwischen ASM und Zytokinen

Obwohl wir durch die ASM-Inhibitoren somit eine signifikante Hemmung einzelner Zytokine feststellen konnten, ging dies jedoch nicht mit einer verminderten Proliferation der Immunzellen einher. Dies deutet darauf hin, dass das Absinken der Zytokinkonzentrationen nicht auf einem Rückgang der aktiven Zellen beruht, sondern spricht dafür, dass die ASM-Inhibition direkte Auswirkungen auf Sekretion der Zytokine hat.

In einer früheren Studie allerdings konnten antiproliferative Effekte durch Sertralin in einigen Zelllinien festgestellt werden [139]. Unabhängig davon kam es aber auch hier zu einer Beeinträchtigung der Zytokinsekretion.

Diese Beobachtung ist in Anbetracht dessen, dass proinflammatorische Zytokine die S-ASM stimulieren können, interessant. Die verstärkte ASM-Aktivierung trägt zur Auslösung von Entzündungsreaktionen bei, was beispielsweise bei der Arteriosklerose pathogenetische Relevanz besitzt [142] (vgl. auch [46]).

Wie bereits erwähnt, konnte im Mausmodell wiederum gezeigt werden, dass die ASM für die Sekretion von IL-2 benötigt wird [120], [121]. Darüber hinaus ist bekannt, dass die saure Sphingomyelinase entscheidende Bedeutung für die Freisetzung zytotoxischer Granula aus CTLs hat und mutmaßlich auch in der Regulation allgemeiner Exozytosevorgänge wie der Sekretion von Zytokinen eingebunden ist [143]. Aufgrund dessen kann vermutet werden, dass die ASM-Inhibitoren in unseren Zellkulturexperimenten vermutlich die Exozytose und damit Sekretion der von T-Zellen gebildeten Zytokine beeinflussen.

Anzumerken ist, dass bereits Studien durchgeführt wurden, in denen der Einfluss antidepressiv wirksamer Medikamente auf die Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Serum von Patienten untersucht wurde. Eine Metaanalyse mehrerer Studien zeigt dabei auf, dass die bei Depression erhöhten Spiegel an TNF, IL-6 und IL-1 β durch Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, nicht jedoch durch andere Substanzklassen, wirksam gesenkt werden [144]. Bemerkenswert ist dies, da die Serotonin-Wiederaufnahmehemmer zu einem Großteil auch ASM-inhibitorisch wirksam sind. Speziell für Sertralin konnte außerdem gezeigt werden, dass es die Sekretion von TNF in menschlichen T-Lymphozyten inhibiert [139].

Insgesamt scheint es wohl eine gegenseitige Wechselwirkung zwischen der sauren Sphingomyelinase und bestimmten Zytokinen zu geben: Zum einen kann die ASM durch proinflammatorische Zytokine stimuliert werden und zum anderen spielt die ASM eine Rolle in der Sekretion von Zytokinen.

Neuere Forschungsergebnisse ergaben darüber hinaus eine Hemmung von Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen bei gleichzeitiger Treg-Expansion in MS-Patienten unter dem Einfluss von Serotonin [146]. Es scheinen also gleich mehrere Faktoren und Signalwege parallel von Bedeutung zu sein, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert.

4.3.6 ASM-Inhibitoren als neue immunmodulatorische Medikamente

Die Bedeutung der sauren Sphingomyelinase für verschiedene Krankheitsbilder wurde lange Zeit unterschätzt, sodass man sich erst vor einigen Jahren ihres Stellenwertes bei unterschiedlichsten Erkrankungen bewusst wurde. Dementsprechend neu sind auch die Versuche durch pharmakologische Einflussnahme auf die ASM-Aktivität therapeutisch begünstigend ins Krankheitsgeschehen einzugreifen.

FIASMAS etwa, von denen viele schon seit Jahrzehnten in der Therapie psychiatrischer Erkrankungen eingesetzt werden, könnten auch positive Effekte bei Alzheimer, Arteriosklerose oder Tumorerkrankungen haben [145]. Zumal eine Inhibition der ASM durch diese Substanzen auch auf Vorgän-

ge des Immunsystems Einfluss nimmt, stellt sich die Frage, ob FIASMAS und andere ASM-Inhibitoren auch als immunmodulatorische Medikamente eingesetzt werden könnten. Bisherige klinische Untersuchungen mit antidepressiven Arzneimitteln legen nahe, dass diese Substanzen durch positive Einflussnahme auf Treg-Zellen [127] und hemmende Wirkung auf Zytokine [144] einen überwiegend immunsuppressiven Effekt ausüben. In Folge dessen könnten Antidepressiva wie SSRIs in der Therapie von Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden [128].

Unklar ist jedoch, ob die Immunsuppression durch eine Inhibition der sauren Sphingomyelinase verursacht wird. Untersuchungen mit ASM-Knock-out-Mäusen und ASM-Inhibitoren zeigen jedenfalls auf, dass eine Hemmung der sauren Sphingomyelinase zur Vermehrung von regulatorischen T-Zellen und zur Suppression des Immunsystems führt [124], [125].

In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass der Einsatz von Sertralin bzw. Citalopram *in vitro* eine Vermehrung von regulatorischen T-Zellen und eine zum Teil veränderte Expression von CD25, CD69 und CTLA-4 bedingt. Es stellt sich die Frage, welche Bedeutung diese Ergebnisse für die Situation *in vivo* haben.

Bisherige klinische Beobachtungen von immunsuppressiven Effekten unter antidepressiver Medikation beschränken sich überwiegend auf Einzelfallbeschreibungen [147].

Diese Tatsache beruht möglicherweise darauf, dass die immunmodulatorische Wirkung von Antidepressiva nur bei einem Teil der Individuen auftreten könnte. Damit stimmt auch überein, dass wir in unseren Experimenten auch nur bei den Respondern eine Vermehrung regulatorischer T-Zellen im α CD3-stimulierten Ansatz beobachteten. Eine therapeutische Anwendung wäre daher möglicherweise in Zukunft auch von der Kenntnis darüber abhängig, ob ein Individuum eine Response aufweisen wird oder nicht. Sie wäre damit als Teil eines individualisierten Medizinkonzeptes anwendbar.

Die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen durch ASM-Inhibition scheint durch Einflussnahme auf den CD3- und CD28-Signalweg bedingt zu sein. Weiterhin kommt es zur Hemmung der Zytokinsekretion von IFN- γ , TNF, IL-10 und IL-5 durch T-Zellen, während keine signifikante Hemmung der Proliferation auftritt. Insgesamt ergänzen unsere Ergebnisse die Erkenntnisse früherer Forschungsarbeiten zur Immunsuppression durch ASM-Inhibitoren bzw. Antidepressiva [117], [124], [125], [139].

Medikamente wie Desipramin, Sertralin oder Citalopram sind klinisch seit Jahrzehnten bekannte Substanzen, die kostengünstig und relativ nebenwirkungsarm sind. Dementsprechend unproblematisch wäre es, ihren Anwendungsbereich zu erweitern und sie auch bei Erkrankungen, die mit einer Überreaktivität des Immunsystems einhergehen, einzusetzen. Im Einklang mit den Erkenntnissen früherer Forschungsarbeiten anderer Arbeitsgruppen

ergibt sich aus unseren Ergebnissen die Annahme, dass derartige Arzneimittel begünstigend auf ein entsprechendes Krankheitsgeschehen einwirken würden. Eine Vermehrung von regulatorischen T-Zellen würde einer Übersteuerung des Immunsystems entgegenwirken und die unkontrollierte Sekretion von Zytokinen durch Gedächtnis-T-Zellen würde gehemmt werden.

4.3.7 Offene Fragen und Zukünftige Forschung

Wenngleich wir neue Erkenntnisse im Hinblick darauf gewinnen könnten, welche Auswirkungen sich aus einer pharmakologischen Inhibition der sauren Sphingomyelinase auf humane regulatorische und konventionelle T-Zellen ergeben, verbleiben viele Fragen.

Unter anderem ist zu beachten, dass es sich bei allen von uns durchgeführten Untersuchungen um in-vitro Experimente handelte. Unklar ist, welche Bedeutung unsere Beobachtungen auf die unmittelbare in-vivo-Situation im Menschen hat.

Klinisch interessant ist die Frage, in wieweit eine derartige Einflussnahme auf das Immunsystem therapeutisch angewendet werden kann.

Derzeit beschränken sich aktuelle Forschungsarbeiten zur pharmakologischen Einflussnahme auf die saure Sphingomyelinase größtenteils auf die bloße Beschreibung beobachtbarer Effekte, während die ursächlich ablaufenden Zellmechanismen noch überwiegend ungeklärt sind.

Ein besseres Verständnis darüber, in welchen Zellsignalwegen die ASM involviert ist und mit welchen anderen Molekülen sie interagiert, wäre dabei nicht nur von akademischen Interesse. Durch gezielte Manipulation von grundlegenden zellulären Mechanismen ergäben sich mutmaßlich vollkommen neue Möglichkeiten für Therapie und Forschung.

Zumal die saure Sphingomyelinase bzw. die verschiedenen Sphingolipide gleichzeitig in mehrere zentrale Zellvorgänge wie Apoptose, Sekretion, Signalvermittlung und Proliferation eingebunden sind, erweist es sich als schwierig, die einzelnen Bedeutungskomponenten der ASM unabhängig voneinander zu untersuchen.

Ein weiteres Problem besteht in der Ermangelung eines spezifischen Inhibitors der sauren Sphingomyelinase. FIASMA sind zwar wirksame Inhibitoren, doch sind sie zugleich SSRIs und nehmen Einfluss auf den Serotoninstoffwechsel. Häufig können beobachtete Effekte als überwiegend ASM-abhängig angenommen werden, wenn beispielsweise die Effektstärke mit dem Grad der Inhibition korreliert und eine Entsprechung in ASM-Knock-out-Mäusen vorliegt. Dennoch stellt die fehlende Selektivität ein Problem dar. Dementsprechend ist noch viel Forschungsarbeit, sowohl klinisch, als auch experimentell erforderlich, um die Hintergründe der ASM-Wirkung in verschiedenen Geweben verstehen zu können und die Erkenntnisse gezielt therapeutisch nutzbar zu machen.

5. Zusammenfassung

Die saure Sphingomyelinase (ASM) stellt durch die Umwandlung von Sphingomyelin in Ceramid und Phosphorylcholin ein zentrales, fein reguliertes Enzym im Sphingolipidmetabolismus dar. Dadurch nimmt es Einfluss auf verschiedene zelluläre Mechanismen wie Signalvermittlung, Endo- und Exozytose und Zellaktivierung. Dementsprechend weitreichend ist auch die Bedeutung der ASM bei verschiedenen Krankheiten wie Arteriosklerose, Depression oder Neoplasien.

Auch auf das Immunsystem, insbesondere auf die Signalvermittlung durch T-Zellen innerhalb des adaptiven Immunsystems, nimmt die saure Sphingomyelinase Einfluss. Aufbauend auf früheren Forschungsarbeiten zur pharmakologischen und genetischen Hemmung der ASM im Mausmodell untersuchten wir, welche Auswirkungen die Hemmung dieses Enzyms in humanen Zellkulturen auf die Population regulatorischer und konventioneller T-Zellen haben.

Hierzu verwendeten wir die beiden selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Sertralin und Citalopram; zwei antidepressiv wirksame Medikamente, die durch eine Verdrängung der ASM von der lysosomalen Membran eine hemmende Wirkung ausüben.

Wir konnten zeigen, dass diese beiden Substanzen sowohl in Maus-T-Zellen, als auch in humanen T-Zellen, in der Lage sind, die Aktivität der sauren Sphingomyelinase zu inhibieren. Durch Kultivierung von Immunzellen der Maus zusammen mit den Inhibitoren konnte darüber hinaus eine Erhöhung der Treg-Zellfrequenz erreicht werden.

Verschiedene Zellkulturexperimente mit humanen PBMCs zeigten weiterhin, dass unter gewissen Umständen so auch eine Vermehrung regulatorischer T-Zellen im Menschen möglich ist, und dass dies mutmaßlich durch Einbindung der ASM im CD3/CD28-Signalweg bedingt ist. In mit α CD3-Antikörper stimulierten experimentellen Ansätzen kam es jedoch nur bei einzelnen Individuen, die als Responder identifiziert werden konnten, zu einer Treg-Zellvermehrung.

Umgekehrt kam es durch externe Zugabe von C6-Ceramid zu einer Ver-

ringerung des Anteils an regulatorischen T-Zellen. Des Weiteren wurden verschiedene Veränderungen im Expressionsverhalten von Treg- und Tconv-Zellen bezüglich CD25, CD69 und CTLA-4 in Anwesenheit der ASM-Inhibitoren beobachtet.

Weiterhin bestätigte sich, dass die pharmakologische Hemmung der sauren Sphingomyelinase auch Auswirkungen auf die Effektorfunktion von T-Zellen hat. Während die Proliferation der Zellen weitgehend unbeeinträchtigt blieb, kam es zu einer verringerten Sekretion der Zytokine IFN γ , TNF, IL-5 und IL-10.

In ihrer Gesamtheit sprechen diese Ergebnisse dafür, dass Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase begünstigend auf Krankheitsgeschehen mit überschießender oder dysregulierter Aktivität des Immunsystems einwirken könnten. Immunmodulatorischen Wirkungen durch Inhibition der ASM erklären möglicherweise auch Einflüsse auf das Immunsystem, die für verschiedene Antidepressiva beschrieben wurden.

Insgesamt ist die Bedeutung der sauren Sphingomyelinase innerhalb der Regulation des adaptiven Immunsystems jedoch noch ein weitgehend ungeklärtes Thema mit vielen offenen Fragen. Daher ist auch in Zukunft weitere klinische und experimentelle Forschung erforderlich, um zu klären, welchen Einfluss dieses Enzyms auf Immunzellen hat und wie sich dieser auch klinisch anwenden lässt.

6. Summary

By catalyzing the transformation of sphingomyeline into ceramide and phosphocholine, the acid sphingomyelinase (ASM) plays a central role in the metabolism of sphingolipids and is tightly regulated. Therefore it takes essential influence upon different cellular mechanisms like signal transduction, endo-/exocytosis and cell activation. Accordingly complex is the importance of the ASM in different diseases like atherosclerosis, depression or neoplastic diseases.

The acid sphingomyelinase also greatly influences the signal mediation of T cells within the adaptive immune system. Based on previous research about the pharmacological and genetic inhibition of the ASM in mice we investigated, which impact an inhibition of this enzyme in human cell cultures may have on the populations of regulatory and conventional T cells.

Therefore we mostly used the two selective serotonin reuptake inhibitors sertraline and citalopram. These two antidepressive drugs detach the ASM from the lysosomal membrane and thereby inhibit the enzyme.

Here we show, that these two substances efficiently inhibit the ASM mice T cells as well as human T cells. Cultivating immune cells of mice together with the inhibitors led to an essential increase in the frequency of regulatory T cells.

Various cell culture experiments with human PBMCs showed that under certain circumstances an increase in regulatory T cells is also possible in the human, most likely due to the involvement of the ASM in the CD3/CD28 signal pathway. Experimental approaches using α CD3-antibodies showed an increase in Treg cells in a fraction of the tested individuals.

External addition of C6-ceramide led to a decrease in the frequency of regulatory T cells. In addition to that, we were able to observe diverse effects regarding the expression of CD25, CD69 and CTLA-4 in Treg and Tconv cells in the presence of the ASM-inhibitors.

We were also able to confirm that the pharmacological inhibition of the acid sphingomyelinase has an impact on the effector functions of T cells.

While there was no effect on cell proliferation, we observed a decreased secretion of the cytokines $\text{IFN}\gamma$, TNF, IL-5 and IL-10.

Alltogether these results indicate that inhibitors of the acid sphingomyelinase might have positive effects in pathologies of overshooting or dysregulated activity of the immune system. Immunomodulatory effects after inhibition of the ASM might also explain observations of an influence of antidepressants on the immune system that have been described in the literature.

Overall the importance of the acid sphingomyelinase within the regulation of the adaptive immune system is a new field of research with many open questions. Therefore further clinical and experimental research is needed to clarify, which impact this enzyme has on immune cells and how this impact might be used therapeutically.

Literaturverzeichnis

- [1] Kaufmann S., Basiswissen Immunologie, ISBN 978-3-642-24166-6, Auszug aus: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 7. Aufl. 2012, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014. DOI: 10.1007/978-3-642-40325-5
- [2] Rink L., Kruse A., Haase H., Immunologie für Einsteiger, ISBN 978-3-662-44842-7, 2. Aufl., Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012, 2015, DOI: 10.1007/978-3-662-44843-4
- [3] Porciello N., Tuosto L., CD28 costimulatory signals in T lymphocyte activation: Emerging functions beyond a qualitative and quantitative support to TCR signaling, *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016 Apr;28:11-9. Epub 2016 Mar 4. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2016.02.004.
- [4] Harrington LE., Mangan PR., Weaver CT., Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage, *Curr Opin Immunol.* 2006 Jun;18(3):349-56. Epub 2006 Apr 17. DOI: 10.1016/j.coi.2006.03.017
- [5] Takahama Y., Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection, *Nat Rev Immunol.* 2006 Feb;6(2):127-35. DOI: 10.1038/nri1781
- [6] Zhu J., Paul WE., Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors, *Immunol Rev.* 2010 Nov;238(1):247-62. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x.
- [7] Mathis D., Benoist C., Back to central tolerance, *Immunity.* 2004 May;20(5):509-16.
- [8] Mellanby RJ., Thomas DC., Lamb J., Role of regulatory T-cells in autoimmunity, *Clin Sci (Lond).* 2009 Apr;116(8):639-49. DOI: 10.1042/CS20080200.
- [9] Xystrakis E., Boswell SE., Hawrylowicz CM., T regulatory cells and the control of allergic disease, *Expert Opin Biol Ther.* 2006 Feb;6(2):121-33. DOI: 10.1517/14712598.6.2.121
- [10] Joshi NS., Akama-Garren EH., Lu Y., Lee DY., Chang GP., Li A., DuPage M., Tammela T., Kerper NR., Farago AF., Robbins R., Crowley DM., Bronson RT., Jacks T., Regulatory T Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Suppress Anti-tumor T Cell Responses, *Immunity.* 2015 Sep 15;43(3):579-90. Epub 2015 Sep 1. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.08.006.
- [11] Papiernik M., Banz A., Natural regulatory CD4 T cells expressing CD25, *Microbes Infect.* 2001 Sep;3(11):937-45.

- [12] Rudensky AY., Regulatory T cells and Foxp3, *Immunol Rev.* 2011 May;241(1):260-8. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01018.x.
- [13] Bennett CL., Christie J., Ramsdell F., Brunkow ME., Ferguson P.J., Whitesell L., Kelly TE., Saulsbury FT., Chance PF., Ochs HD., The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3, *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):20-1. DOI: 10.1038/83713.
- [14] Schütt C., Bröker B., *Grundwissen Immunologie*, ISBN 978-3-8274-2646-8, 3. Auflage 2011, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2011. DOI: 10.1007/978-3-8274-2647-5.
- [15] Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., Niwa A., Parizot C., Taffin C., Heike T., Valeyre D., Mathian A., Nakahata T., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M., Amoura Z., Gorochoy G., Sakaguchi S., Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor, *Immunity.* 2009 Jun 19;30(6):899-911. Epub 2009 May 21. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.03.019.
- [16] Tai X., Cowan M., Feigenbaum L., Singer A., CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2, *Nat Immunol.* 2005 Feb;6(2):152-62. Epub 2005 Jan 9. DOI: 10.1038/ni1160.
- [17] Feuerer M., Hill JA., Mathis D., Benoist C., Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes, *Nat Immunol.* 2009 Jul;10(7):689-95. DOI: 10.1038/ni.1760.
- [18] Vignali D., Collison L., Workman C., How regulatory T cells work, *Nat Rev Immunol.* 2008 Jul; 8(7): 523–532. DOI: 10.1038/nri2343.
- [19] Zhao DM., Thornton AM., DiPaolo RJ., Shevach EM., Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes, *Blood.* 2006 May 15;107(10):3925-32. Epub 2006 Jan 17. DOI: 10.1182/blood-2005-11-4502.
- [20] Cao X., Cai SF., Fehniger TA., Song J., Collins LI., Piwnicka-Worms DR., Ley TJ., Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance, *Immunity.* 2007 Oct;27(4):635-46. Epub 2007 Oct 4. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.08.014.
- [21] Pandiyan P., Zheng L., Ishihara S., Reed J., Lenardo MJ., CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells, *Nat Immunol.* 2007 Dec;8(12):1353-62. Epub 2007 Nov 4. DOI: 10.1038/ni1536.
- [22] Oderup C., Cederbom L., Makowska A., Cilio CM., Ivars F., Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression, *Immunology.* 2006 Jun;118(2):240-9. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2006.02362.x.
- [23] Bartke N., Hannun YA., Bioactive sphingolipids: metabolism and function, *Journal of lipid research*, 2009, 50: S91–S96. DOI: 10.1194/jlr.R800080-JLR200.
- [24] Goni F., Alonso A., Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity, *FEBS Letters* 531 (2002) 38-46, DOI: 10.1016/s0014-5793(02)03482-8.

- [25] Cinqolani F., Futerman AH., Casas J., Ceramide synthases in biomedical research, *Chem Phys Lipids*. 2016 May;197:25-32. chemphyslip.2015.07.026. Epub 2015 Aug 3. DOI: 10.1016/j.
- [26] Okino N., He X., Gatt S., Sandhoff K., Ito M., Schuchman EH., *J Biol Chem*. 2003 Aug 8;278(32):29948-53. Epub 2003 May 22. DOI: 10.1074/jbc.M303310200.
- [27] Hannun Y., Obeid L., The Ceramide-centric Universe of Lipid-mediated Cell Regulation: Stress Encounters of the Lipid Kind, *JBC Papers in Press*, May 13, 2002, DOI 10.1074/jbc.R20000820
- [28] Hannun Y., Luberto C., Argraves K., Enzymes of Sphingolipid Metabolism: From Modular to Integrative Signaling, *Biochemistry*, April 24, 2001. DOI: 10.1021/bi002836k.
- [29] Kolesnick R., Fuks Z., Radiation and ceramide-induced apoptosis, *Oncogene*, 2003. DOI: 10.1038/sj.onc.1206702.
- [30] Simons K., Toomre D., Lipid Rafts and Signal Transduction, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Mar. DOI: 10.1038/35036052.
- [31] Siskind L.J., Colombini M., The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis, *J Biol Chem*. 2000 Dec 8;275(49):38640-4. DOI: 10.1074/jbc.C000587200.
- [32] Heinrich M., Wickel M., Schneider-Brachert W., Sandberg C., Gahr J., Schwandner R., Weber T., Saftig P., Peters C., Brunner J., Krönke M., Schütze S., Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide, *EMBO J*. 1999 Oct 1;18(19):5252-63. DOI: 10.1093/emboj/18.19.5252.
- [33] Zhang Y., Yao B., Delikat S., Bayoumy S., Lin XH., Basu S., McGinley M., Chan-Hui PY., Lichenstein H., Kolesnick R., Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase, *Cell*. 1997 Apr 4;89(1):63-72. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80183-x.
- [34] Huwiler A., Johansen B., Skarstad A., Pfeilschifter J., Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A2 and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release, *FASEB J*. 2001 Jan;15(1):7-9. Epub 2000 Nov 9. DOI: 10.1096/fj.00-0370fje.
- [35] Huwiler A., Fabbro D, Pfeilschifter J., Selective ceramide binding to protein kinase C-alpha and -delta isoenzymes in renal mesangial cells, *Biochemistry*. 1998 Oct 13;37(41):14556-62. DOI: 10.1021/bi981401i.
- [36] Hage-Sleiman R., Hamze AB., El-Hed AF., Attieh R., Kozhaya L., Kabbani S., Dbaibo G., Ceramide inhibits PKC θ by regulating its phosphorylation and translocation to lipid rafts in Jurkat cells, *Immunol Res*. 2016 Aug;64(4):869-86. DOI: 10.1007/s12026-016-8787-9.
- [37] Hannun YA., Loomis C., Merrill A.Jr., Bell R., Sphingosine Inhibition of Protein Kinase C Activity and of Phorbol Dibutyrate Binding in Vitro and in Human Platelets, *The Journal of Biological Chemistry*, September 25, 1986.
- [38] Baier G., Wagner J. PKC inhibitors: potential in T cell-dependent immune diseases, *Current Opinion in Cell Biology* 2009, DOI: 10.1016/j.ceb.2008.12.008.

- [39] Guo B., Su T., Rawlings DJ., Protein kinase C family functions in B-cell activation, *Current Opinion in Immunology* 2004. DOI: 10.1016/j.coi.2004.03.012.
- [40] Cremestia A., Gonib F., Kolesnick R., Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome?, *FEBS Letters* 531 (2002) 47-53. DOI: 10.1016/s0014-5793(02)03489-0.
- [41] Duan R., Alkaline sphingomyelinase: An old enzyme with novel implications, *Biochimica et Biophysica Acta*, March 2006. DOI: 10.1016/j.bbali.2006.03.007.
- [42] Clarke C., Wu B., Hannun Y., The Neutral Sphingomyelinase Family: Identifying Biochemical, *Adv Enzyme Regul*, 2001. DOI: 10.1016/j.advenreg.2010.09.016.
- [43] Schuchmann E., Acid sphingomyelinase, cell membranes and human disease: Lessons from Niemann–Pick disease, *FEBS Letters* 584 (2010) 1895–1900. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.11.083.
- [44] Jenkins R., Canals D., Hannun Y., Roles and Regulation of Secretory and Lysosomal Acid Sphingomyelinase, *Cell Signal*. 2009 June ; 21(6): 836–846
- [45] Grassme H., Jekle A., Riehle A., Schwarz H., Berger J., Sandhoff K., Kolesnick R., Gulbins E., CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts, *J Biol Chem*. 2001 Jun 8;276(23):20589-96. Epub 2001 Mar 12. DOI: 10.1074/jbc.M101207200.
- [46] Kornhuber J., Rhein C., Müller C., Mühle C., Secretory sphingomyelinase in health and disease, *Biol. Chem.* 2015; 396(6-7): 707–736. DOI: 10.1515/hsz-2015-0109.
- [47] Smith E., Schuchman E., The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases, *FASEB J*. 2008 Oct;22(10):3419-31. doi: 10.1096/fj.08-108043. Epub 2008 Jun 20. DOI: 10.1096/fj.08-108043.
- [48] Luft F., Acid sphingomyelinase, autophagy, and atherosclerosis, *J Mol Med* (2014) 92:429–431. DOI: 10.1007/s00109-014-1134-5.
- [49] Xu XX., Tabas I., Sphingomyelinase Enhances Low Density Lipoprotein Uptake and Ability to Induce Cholesteryl Ester Accumulation in Macrophages, *JBC*, 1991
- [50] Kinnunen P., Holopainen J., Sphingomyelinase Activity of LDL: A Link between Atherosclerosis, Ceramide, and Apoptosis?, *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:37–42
- [51] Münzer P., Borst O., Walker B., Schmid E., Feijge MA., Cosemans JM., Chatterjee M., Schmidt EM., Schmidt S., Towhid ST., Leibrock C., Elvers M., Schaller M., Seizer P., Ferlinz K., May AE., Gulbins E., Heemskerk JW., Gawaz M., Lang F., Acid sphingomyelinase regulates platelet cell membrane scrambling, secretion, and thrombus formation, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Jan;34(1):61-71. Epub 2013 Nov 14. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300210.
- [52] Górska M., Barańczuk E., Dobrzyń A., Secretory Zn²⁺-dependent Sphingomyelinase Activity in the Serum of Patients with Type 2 Diabetes is Elevated, *Horm Metab Res*. 2003 Aug;35(8):506-7. DOI: 10.1055/s-2003-41810.
- [53] Chaurasia B., Summers S., Ceramides - Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders, *Trends Endocrinol Metab*. 2015 Oct;26(10):538-50. DOI: 10.1016/j.tem.2015.07.006.

- [54] Kanety H., Hemi R., Papa M., Karasik A., Sphingomyelinase and Ceramide Suppress Insulin-induced Tyrosine Phosphorylation of the Insulin Receptor Substrate-1, *J Biol Chem.* 1996 Apr 26;271(17):9895-7. DOI: 10.1074/jbc.271.17.9895.
- [55] Herschkovitz A., Liu Y., Ilan E., Ronen D., Boura-Halfon S., Zick Y., Common Inhibitory Serine Sites Phosphorylated by IRS-1 Kinases, Triggered by Insulin and Inducers of Insulin Resistance, *J Biol Chem.* 2007 Jun 22;282(25):18018-27. Epub 2007 Apr 19. DOI: 10.1074/jbc.M610949200.
- [56] Galadari S., Rahman A., Pallichankandy S., Galadari A., Thayyullathil F., Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms, *Lipids Health Dis.* 2013 Jul 8;12:98. DOI: 10.1186/1476-511X-12-98.
- [57] Selzner M., Bielawska A., Morse M., Rüdiger H., Sindram D., Hannun Y., Clavien PA., Induction of Apoptotic Cell Death and Prevention of Tumor Growth by Ceramide Analogues in Metastatic Human Colon Cancer, *Biochemistry (Mosc).* 1998 Sep;63(9):1057-60.
- [58] Riboni L., Campanella R., Bassi R., Villani R., Gaini S., Martinelli-Boneschi F., Viani P., Tettamanti G., Ceramide Levels Are Inversely Associated With Malignant Progression of Human Glial Tumors, *Glia.* 2002 Aug;39(2):105-13. DOI: 10.1002/glia.10087.
- [59] Osawa Y., Suetsugu A., Matsushima-Nishiwaki R., Yasuda I., Saibara T., Moriwaki H., Seishima M., Kozawa O., Liver acid sphingomyelinase inhibits growth of metastatic colon cancer, *J Clin Invest.* 2013 Feb;123(2):834-43. Epub 2013 Jan 9. DOI: 10.1172/JCI65188.
- [60] Prinetti A., Millimaggi D., D'Ascenzo S., Clarkson M., Bettiga A., Chigorno V., Sonnino S., Pavan A., Dolo V., Lack of ceramide generation and altered sphingolipid composition are associated with drug resistance in human ovarian carcinoma cells, *Biochem J.* 2006 Apr 15;395(2):311-8. DOI: 10.1042/BJ20051184.
- [61] Lacour S., Hammann A., Grazide S., Lagadic-Gossmann D., Athias A., Sergeant O., Laurent G., Gambert P., Solary E., Dimanche-Boitrel MT., Cisplatin-Induced CD95 Redistribution into Membrane Lipid Rafts of HT29 Human Colon Cancer Cells, *Cancer Res.* 2004 May 15;64(10):3593-8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2787.
- [62] Ong WY., Herr DR., Farooqui T., Ling EA., Farooqui AA., Role of sphingomyelinases in neurological disorders, *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19(12):1725-42. Epub 2015 Aug 4. DOI: 10.1517/14728222.2015.1071794.
- [63] Morishima-Kawashima M., Ihara Y., Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau, *J Neurosci Res.* 2002 Nov 1;70(3):392-401. DOI: 10.1002/jnr.10355.
- [64] Wenk GL., Neuropathologic changes in Alzheimer's disease, *J Clin Psychiatry.* 2003;64 Suppl 9:7-10.
- [65] He X., Huang Y., Li B., Gong CX., Schuchman EH., Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging.* 2010 Mar;31(3):398-408. Epub 2008 Jun 10. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.010.
- [66] Lee JK., Jin HK., Park MH., Kim BR., Lee PH., Nakauchi H., Carter JE., He X., Schuchman EH., Bae JS., Acid sphingomyelinase modulates the autophagic process by controlling lysosomal biogenesis in Alzheimer's disease, *J Exp Med.* 2014 Jul 28;211(8):1551-70. Epub 2014 Jul 21. DOI: 10.1084/jem.20132451.

- [67] Lee JK., Jin HK., Bae JS., ASM in Alzheimer's disease, *Oncotarget*. 2015 Nov 24;6(37):39389-90. DOI: 10.18632/oncotarget.6333.
- [68] Dagan E., Adir V., Schlesinger I., Borochowitz Z., Ayoub M., Mory A., Nassar M., Kurolap A., Aharon-Peretz J., Gershoni-Baruch R., SMPD1 mutations and Parkinson disease, *Parkinsonism Relat Disord*. 2015 Oct;21(10):1296-7. Epub 2015 Aug 20. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2015.08.019.
- [69] Gan-Or Z., Orr-Urtreger A., Alcalay RN., Bressman S., Giladi N., Rouleau GA., The emerging role of SMPD1 mutations in Parkinson's disease: Implications for future studies, *Parkinsonism Relat Disord*. 2015 Oct;21(10):1294-5. Epub 2015 Aug 20. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2015.08.018.
- [70] van Doorn R., Nijland PG., Dekker N., Witte ME., Lopes-Pinheiro MA., van het Hof B., Kooij G., Reijkerkerk A., Dijkstra C., van van der Valk P., van Horsen J., de Vries HE., Fingolimod attenuates ceramide-induced blood-brain barrier dysfunction in multiple sclerosis by targeting reactive astrocytes, *Acta Neuropathol*. 2012 Sep;124(3):397-410. Epub 2012 Jul 19. DOI: 10.1007/s00401-012-1014-4.
- [71] Belmaker RH., Agam G., Major depressive disorder, *N Engl J Med*. 2008 Jan 3;358(1):55-68. DOI: 10.1056/NEJMra073096.
- [72] Sahay A., Hen R., Adult hippocampal neurogenesis in depression, *Nat Neurosci*. 2007 Sep;10(9):1110-5. DOI: 10.1038/nn1969.
- [73] Gulbins E., Walter S., Becker KA., Halmer R., Liu Y., Reichel M., Edwards MJ., Müller CP., Fassbender K., Kornhuber J., A central role for the acid sphingomyelinase/ceramide system in neurogenesis and major depression, *J Neurochem*. 2015 Jul;134(2):183-92. Epub 2015 May 23. DOI: 10.1111/jnc.13145.
- [74] Beckmann N., Sharma D., Gulbins E., Becker KA., Edelmann B., inhibition of acid sphingomyelinase by tricyclic antidepressants and analogons, *Front Physiol*. 2014 Sep 2;5:331. eCollection 2014. DOI: 10.3389/fphys.2014.00331.
- [75] Jernigan PL., Hoehn R., Grassmé H., Edwards MJ., Müller CP., Kornhuber J., Gulbins E., Sphingolipids in Major Depression, *Neurosignals*. 2015;23(1):49-58. Epub 2015 Dec 19. DOI: 10.1159/000442603.
- [76] Gulbins E., Palmada M., Reichel M., Lüth A., Böhmer C., Amato D., Müller CP., Tischbirek CH., Groemer TW., Tabatabai G., Becker KA., Tripal P., Staedtler S., Ackermann TF., van Brederode J., Alzheimer C., Weller M., Lang UE., Kleuser B., Grassmé H., Kornhuber J., Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs., *Nat Med*. 2013 Jul;19(7):934-8. Epub 2013 Jun 16. DOI: 10.1038/nm.3214.
- [77] Kornhuber J., Medlin A., Bleich S., Jendrossek V., Henkel AW., Wiltfang J., Gulbins E., High activity of acid sphingomyelinase in major depression, *J Neural Transm (Vienna)*. 2005 Nov;112(11):1583-90. DOI: 10.1007/s00702-005-0374-5.
- [78] Seitz AP., Grassmé H., Edwards MJ., Pewzner-Jung Y., Gulbins E., Ceramide and sphingosine in pulmonary infections, *Biol Chem*. 2015 Jun;396(6-7):611-20. DOI: 10.1515/hsz-2014-0285.
- [79] Grassmé H., Gulbins E., Brenner B., Ferlinz K., Sandhoff K., Harzer K., Lang F., Meyer TF., Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells, *Cell*. 1997 Nov 28;91(5):605-15. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80448-1.

- [80] Simonis A., Hebling S., Gulbins E., Schneider-Schaulies S., Schubert-Unkmeir A., Differential activation of acid sphingomyelinase and ceramide release determines invasiveness of *Neisseria meningitidis* into brain endothelial cells, *PLoS Pathog.* 2014 Jun 12;10(6):e1004160. eCollection 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004160.
- [81] Grassmé H., Jendrossek V., Riehle A., von Kürthy G., Berger J., Schwarz H., Weller M., Kolesnick R., Gulbins E., Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts, *Nat Med.* 2003 Mar;9(3):322-30. Epub 2003 Feb 3. DOI: 10.1038/nm823.
- [82] Shin JS., Gao Z., Abraham SN., Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells., *Science.* 2000 Aug 4;289(5480):785-8. DOI: 10.1126/science.289.5480.785.
- [83] Wooldridge KG., Williams PH., Ketley JM., Host signal transduction and endocytosis of *Campylobacter jejuni*, *Microb Pathog.* 1996 Oct;21(4):299-305. DOI: 10.1006/mpat.1996.0063.
- [84] Gatfield J., Pieters J., Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages, *Science.* 2000 Jun 2;288(5471):1647-50. DOI: 10.1126/science.288.5471.1647
- [85] Manié SN., de Breyne S., Vincent S., Gerlier D., Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly, *J Virol.* 2000 Jan;74(1):305-11. DOI: 10.1128/jvi.74.1.305-311.2000.
- [86] Scheiffle P., Rietveld A., Wilk T., Simons K., Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane, *J Biol Chem.* 1999 Jan 22;274(4):2038-44. DOI: 10.1074/jbc.274.4.2038.
- [87] Grassmé H., Riehle A., Wilker B., Gulbins E., Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms, *J Biol Chem.* 2005 Jul 15;280(28):26256-62. Epub 2005 May 10. DOI: 10.1074/jbc.M500835200.
- [88] Jan JT., Chatterjee S., Griffin DE., Sindbis virus entry into cells triggers apoptosis by activating sphingomyelinase, leading to the release of ceramide, *J Virol.* 2000 Jul;74(14):6425-32. DOI: 10.1128/jvi.74.14.6425-6432.2000.
- [89] Olliaro P., Castelli F., *Plasmodium falciparum*: an electronmicroscopy study of caveolae and trafficking between the parasite and the extracellular medium., *Int J Parasitol.* 1997 Sep;27(9):1007-12.
- [90] Kaneko K., Vey M., Scott M., Pilkuhn S., Cohen FE., Prusiner SB., COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Mar 18;94(6):2333-8. DOI: 10.1073/pnas.94.6.2333.
- [91] Peng H., Li C., Kadow S., Henry BD., Steinmann J., Becker KA., Riehle A., Beckmann N., Wilker B., Li PL., Pritts T., Edwards MJ., Zhang Y., Gulbins E., Grassmé H., Acid sphingomyelinase inhibition protects mice from lung edema and lethal *Staphylococcus aureus* sepsis, *J Mol Med (Berl).* 2015 Jun;93(6):675-89. Epub 2015 Jan 25. DOI: 10.1007/s00109-014-1246-y.
- [92] Schneider-Schaulies J., Schneider-Schaulies S., Sphingolipids in viral infection, *Biol Chem.* 2015 Jun;396(6-7):585-95. DOI: 10.1515/hsz-2014-0273.

- [93] Avota E., Gulbins E., Schneider-Schaulies S., DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells, *PLoS Pathog.* 2011 Feb;7(2):e1001290. Epub 2011 Feb 17. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001290.
- [94] Avota E., Schneider-Schaulies S., The role of sphingomyelin breakdown in measles virus immunomodulation, *Cell Physiol Biochem.* 2014;34(1):20-6. Epub 2014 Jun 16. DOI: 10.1159/000362981.
- [95] Miller ME., Adhikary S., Kolokoltsov AA., Davey RA., Ebolavirus requires acid sphingomyelinase activity and plasma membrane sphingomyelin for infection, *J Virol.* 2012 Jul;86(14):7473-83. Epub 2012 May 9. DOI: 10.1128/JVI.00136-12.
- [96] Teichgräber V., Ulrich M., Endlich N., Riethmüller J., Wilker B., De Oliveira-Munding CC., van Heeckeren AM., Barr ML., von Kürthy G., Schmid KW., Weller M., Tümmler B., Lang F., Grassme H., Döring G., Gulbins E., Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis, *Nat Med.* 2008 Apr;14(4):382-91. Epub 2008 Mar 30. DOI: 10.1038/nm1748.
- [97] Grammatikos G., Mühle C., Ferreiros N., Schroeter S., Bogdanou D., Schwalm S., Hintereder G., Kornhuber J., Zeuzem S., Sarrazin C., Pfeilschifter J., Serum acid sphingomyelinase is upregulated in chronic hepatitis C infection and non alcoholic fatty liver disease, *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jul;1841(7):1012-20. Epub 2014 Apr 25. DOI: 10.1016/j.bbali.2014.04.007.
- [98] Lang PA., Schenck M., Nicolay JP., Becker JU., Kempe DS., Lupescu A., Koka S., Eisele K., Klarl BA., Rübber H., Schmid KW., Mann K., Hildenbrand S., Hefter H., Huber SM., Wieder T., Erhardt A., Häussinger D., Gulbins E., Lang F., Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide, *Nat Med.* 2007 Feb;13(2):164-70. Epub 2007 Jan 28. DOI: 10.1038/nm1539.
- [99] Kölzer M., Werth N., Sandhoff K., Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine, *FEBS Lett.* 2004 Feb 13;559(1-3):96-8.
- [100] Kornhuber J., Muehlbacher M., Trapp S., Pechmann S., Friedl A., Reichel M., Mühle C., Terflath L., Groemer TW., Spitzer GM., Liedl KR., Gulbins E., Tripal P., Identification of novel functional inhibitors of acid sphingomyelinase, *PLoS One.* 2011;6(8):e23852. Epub 2011 Aug 31. DOI: 10.1371/journal.pone.0023852.
- [101] Beckmann N., Sharma D., Gulbins E., Becker KA., Edelmann B., Inhibition of acid sphingomyelinase by tricyclic antidepressants and analogons, *Front Physiol.* 2014 Sep 2;5:331. eCollection 2014. DOI: 10.3389/fphys.2014.00331.
- [102] Hurwitz R., Ferlinz K., Sandhoff K., The tricyclic antidepressant desipramine causes proteolytic degradation of lysosomal sphingomyelinase in human fibroblasts, *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1994 Jul;375(7):447-50.
- [103] Elojeimy S., Holman DH., Liu X., El-Zawahry A., Villani M., Cheng JC., Mahdy A., Zeidan Y., Bielwaska A., Hannun YA., Norris JS., New insights on the use of desipramine as an inhibitor for acid ceramidase, *FEBS Lett.* 2006 Aug 21;580(19):4751-6. Epub 2006 Aug 4. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.07.071.
- [104] Arenz C., Small molecule inhibitors of acid sphingomyelinase, *Cell Physiol Biochem.* 2010;26(1):1-8. doi: 10.1159/000315100. Epub 2010 May 18.

- [105] Roth AG., Drescher D., Yang Y., Redmer S., Uhlig S., Arenz C., Potent and selective inhibition of acid sphingomyelinase by bisphosphonates., *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(41):7560-3. DOI: 10.1002/anie.200903288.
- [106] Okudaira C., Ikeda Y., Kondo S., Furuya S., Hirabayashi Y., Koyano T., Saito Y., Umezawa K., Inhibition of acidic sphingomyelinase by xanthone compounds isolated from *Garcinia speciosa*, *J Enzyme Inhib.* 2000;15(2):129-38.
- [107] Fucho R., Martínez L., Baulies A., Torres S., Tarrats N., Fernandez A., Ribas V., Astudillo AM., Balsinde J., Garcia-Rovés P., Elena M., Bergheim I., Lotersztajn S., Trautwein C., Appelqvist H., Paton AW., Paton JC., Czaja MJ., Kaplowitz N., Fernandez-Checa JC., García-Ruiz C., ASMase regulates autophagy and lysosomal membrane permeabilization and its inhibition prevents early stage non-alcoholic steatohepatitis, *J Hepatol.* 2014 Nov;61(5):1126-34. Epub 2014 Jun 16. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.06.009.
- [108] Gülhan B., Özçelik U., Gürakan F., Güçer S., Orhan D., Cinel G., Yalçın E., Ersöz DD., Kiper N., Yüce A., Kale G., Different features of lung involvement in Niemann-Pick disease and Gaucher disease, *Respir Med.* 2012 Sep;106(9):1278-85. Epub 2012 Jul 10. DOI: 10.1016/j.rmed.2012.06.014.
- [109] Lewis RS., Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes, *Annu Rev Immunol.* 2001;19:497-521. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.497.
- [110] Samakai E., Hooper R., Soboloff J., The critical role of STIM1-dependent Ca²⁺ signalling during T-cell development and activation, *Int J Biochem Cell Biol.* 2013 Nov;45(11):2491-5. Epub 2013 Jul 29. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.07.014.
- [111] Tskvitaria-Fuller I., Rozelle AL., Yin HL., Wülfing C., Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization, *J Immunol.* 2003 Sep 1;171(5):2287-95. DOI: 10.4049/jimmunol.171.5.2287.
- [112] Razaq TM., Ozegbe P., Jury EC., Sembi P., Blackwell NM., Kabouridis PS., Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains, *Immunology.* 2004 Dec;113(4):413-26. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01998.x.
- [113] Harder T., Lipid raft domains and protein networks in T-cell receptor signal transduction, *Curr Opin Immunol.* 2004 Jun;16(3):353-9. DOI: Harder T., Lipid raft domains and protein networks in T-cell receptor signal transduction, *Curr Opin Immunol.*
- [114] Church LD., Hessler G., Goodall JE., Rider DA., Workman CJ., Vignali DA., Bacon PA., Gulbins E., Young SP., TNFR1-induced sphingomyelinase activation modulates TCR signaling by impairing store-operated Ca²⁺ influx, *J Leukoc Biol.* 2005 Jul;78(1):266-78. Epub 2005 Apr 7. DOI: 10.1189/jlb.1003456.
- [115] Lepple-Wienhues A., Belka C., Laun T., Jekle A., Walter B., Wieland U., Welz M., Heil L., Kun J., Busch G., Weller M., Bamberg M., Gulbins E., Lang F., Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 23; 96(24): 13795–13800. PMCID: PMC24144 *Cell Biology.* DOI: 10.1073/pnas.96.24.13795.
- [116] Mathes C., Fleig A., Penner R., Calcium release-activated calcium current (ICRAC) is a direct target for sphingosine, *J Biol Chem.* 1998 Sep 25;273(39):25020-30. DOI: 10.1074/jbc.273.39.25020.

- [117] Bai A., Kokkotou E., Zheng Y., Robson SC., Role of acid sphingomyelinase bio-activity in human CD4+ T-cell activation and immune responses, *Cell Death Dis.* 2015 Jul 23;6:e1828. DOI: 10.1038/cddis.2015.178.
- [118] Bai A., Guo Y., Acid sphingomyelinase mediates human CD4+ T-cell signaling: potential roles in T-cell responses and diseases, *Cell Death Dis.* 2017 Jul; 8(7): e2963. DOI: 10.1038/cddis.2017.360.
- [119] Beyersdorf N., Müller N., Sphingomyelin breakdown in T cells: role in activation, effector functions and immunoregulation, *Biol Chem.* 2015 Jun;396(6-7):749-58. DOI: 10.1515/hsz-2014-0282.
- [120] Stoffel B., Bauer P., Nix M., Deres K., Stoffel W., Ceramide-independent CD28 and TCR signaling but reduced IL-2 secretion in T cells of acid sphingomyelinase-deficient mice, *Eur J Immunol.* 1998 Mar;28(3):874-80. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199803)28:03<874::AID-IMMU874>3.0.CO;2-T.
- [121] Tischner D., Theiss J., Karabinskaya A., van den Brandt J., Reichardt SD., Karow U., Herold MJ., Lühder F., Utermöhlen O., Reichardt HM., Acid sphingomyeli-nase is required for protection of effector memory T cells against glucocorticoid-induced cell death, *J Immunol.* 2011 Nov 1;187(9):4509-16. Epub 2011 Sep 23. DOI: 10.4049/jimmunol.1100911.
- [122] Bai A., Moss A., Kokkotou E., Usheva A., Sun X., Cheifetz A., Zheng Y., Longhi MS., Gao W., Wu Y., Robson SC., CD39 and CD161 modulate Th17 responses in Crohn's disease, *J Immunol.* 2014 Oct 1;193(7):3366-77. Epub 2014 Aug 29. DOI: 10.4049/jimmunol.1400346.
- [123] Lopes Pinheiro MA., Kroon J., Hoogenboezem M., Geerts D., van Het Hof B., van der Pol SM., van Buul JD., de Vries HE., Acid Sphingomyelinase-Derived Ceramide Regulates ICAM-1 Function during T Cell Transmigration across Brain Endothelial Cells, *J Immunol.* 2016 Jan 1;196(1):72-9. Epub 2015 Nov 23. DOI: 10.4049/jimmunol.1500702.
- [124] Zhou Y., Salker MS., Walker B., Münzer P., Borst O., Gawaz M., Gulbins E., Singh Y., Lang F., Acid Sphingomyelinase (ASM) is a Negative Regulator of Regulatory T Cell (Treg) Development, *Cell Physiol Biochem.* 2016 Aug 12;39(3):985-995. DOI: 10.1159/000447806.
- [125] Hollmann C., Werner S., Avota E., Reuter D., Japtok L., Kleuser B., Gulbins E., Becker KA., Schneider-Schaulies J., Beyersdorf N., Inhibition of Acid Sphingo-myelinase Allows for Selective Targeting of CD4+ Conventional versus Foxp3+ Regulatory T Cells, *J Immunol.* 2016 Oct 15;197(8):3130-3141. Epub 2016 Sep 16. DOI: 10.4049/jimmunol.1600691.
- [126] Schneider-Schaulies J., Beyersdorf N., CD4+ Foxp3+ regulatory T cell-mediated immunomodulation by anti-depressants inhibiting acid sphingomyelinase. *Biol Chem.* 2018 Sep 25;399(10):1175-1182. DOI: 10.1515/hsz-2018-0159.
- [127] Himmerich H., Milenović S., Fulda S., Plümäkers B., Sheldrick AJ., Michel TM., Kircher T., Rink L., Regulatory T cells increased while IL-1 β decreased during antidepressant therapy, *J Psychiatr Res.* 2010 Nov;44(15):1052-7. Epub 2010 Apr 21. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2010.03.005.

- [128] Gobin V., Van Steendam K., Denys D., Deforce D., Selective serotonin reuptake inhibitors as a novel class of immunosuppressants, *Int Immunopharmacol.* 2014 May;20(1):148-56. Epub 2014 Mar 6. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.02.030.
- [129] Römer PS., Berr S., Avota E., Na SY., Battaglia M., ten Berge I., Einsele H., Hünig T., Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412, *Blood.* 2011 Dec 22;118(26):6772-82. Epub 2011 Sep 19. DOI: 10.1182/blood-2010-12-319780.
- [130] Kornhuber J., Müller CP., Becker KA., Reichel M., Gulbins E., The ceramide system as a novel antidepressant target, *Trends Pharmacol Sci.* 2014 Jun;35(6):293-304. Epub 2014 May 1. DOI: 10.1016/j.tips.2014.04.003.
- [131] Marken PA., Munro JS., Selecting a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor: Clinically Important Distinguishing Features, *Prim Care Companion J Clin Psychiatry.* 2000 Dec;2(6):205-210. DOI: 10.4088/pcc.v02n0602.
- [132] Hayasaka Y., Purgato M., Magni LR., Ogawa Y., Takeshima N., Cipriani A., Barbui C., Leucht S., Furukawa TA., Dose equivalents of antidepressants: Evidence-based recommendations from randomized controlled trials, *J Affect Disord.* 2015 Jul 15;180:179-84. Epub 2015 Mar 31. DOI: 10.1016/j.jad.2015.03.021.
- [133] Patel J., Spencer EP., Flanagan RJ., HPLC of sertraline and nortriptyline in plasma or serum, *Biomed Chromatogr.* 1996 Nov-Dec;10(6):351-4. DOI: 10.1002/(SICI)1099-0801(199611)10:6<351::AID-BMC620>3.0.CO;2-O.
- [134] Fredricson Overø K., Kinetics of citalopram in man; plasma levels in patients, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1982;6(3):311-8.
- [135] Boucher LM., Wiegmann K., Fütterer A., Pfeffer K., Machleidt T., Schütze S., Mak TW., Krönke M., CD28 signals through acidic sphingomyelinase, *J Exp Med.* 1995 Jun 1;181(6):2059-68. DOI: 10.1084/jem.181.6.2059.
- [136] Kavanagh B., O'Brien S., Lee D., Hou Y., Weinberg V., Rini B., Allison JP., Small EJ., Fong L., CTLA4 blockade expands FoxP3+ regulatory and activated effector CD4+ T cells in a dose-dependent fashion, *Blood.* 2008 Aug 15;112(4):1175-83. Epub 2008 Jun 3. DOI: 10.1182/blood-2007-11-125435.
- [137] Kue CS., Lim HX., Jung MY., Hong HJ., Cho D., Kim TS., C6-ceramide in combination with transforming growth factor- β enhances Treg cell differentiation and stable FoxP3 expression in vitro and in vivo, *Immunobiology.* 2013 Jul;218(7):952-9. Epub 2012 Nov 21. DOI: 10.1016/j.imbio.2012.11.003.
- [138] Devarajan P., Chen Z., Autoimmune effector memory T cells: the bad and the good, *Immunol Res.* 2013 Dec;57(1-3):12-22. DOI: 10.1007/s12026-013-8448-1.
- [139] Taler M., Gil-Ad I., Lomnitski L., Korov I., Baharav E., Bar M., Zolotkov A., Weizman A., Immunomodulatory effect of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) on human T lymphocyte function and gene expression, *Eur Neuropsychopharmacol.* 2007 Dec;17(12):774-80. Epub 2007 May 14. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2007.03.010.
- [140] Skurkovich S., Skurkovich B., Anticytokine therapy, especially anti-interferon-gamma, as a pathogenetic treatment in TH-1 autoimmune diseases, *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1051:684-700. DOI: 10.1196/annals.1361.113.

- [141] Skurkovich B., Skurkovich S., Inhibition of IFN-gamma as a method of treatment of various autoimmune diseases, including skin diseases, Ernst Schering Res Found Workshop. 2006;(56):1-27.
- [142] Wong ML., Xie B., Beatini N., Phu P., Marathe S., Johns A., Gold PW., Hirsch E., Williams KJ., Licinio J., Tabas I., Acute systemic inflammation up-regulates secretory sphingomyelinase in vivo: a possible link between inflammatory cytokines and atherogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jul 18;97(15):8681-6. DOI: 10.1073/pnas.150098097.
- [143] Herz J., Pardo J., Kashkar H., Schramm M., Kuzmenkina E., Bos E., Wiegmann K., Wallich R., Peters PJ., Herzig S., Schmelzer E., Krönke M., Simon MM., Utermöhlen O., Acid sphingomyelinase is a key regulator of cytotoxic granule secretion by primary T lymphocytes, *Nat Immunol.* 2009 Jul;10(7):761-8. Epub 2009 Jun 14. DOI: 10.1038/ni.1757.
- [144] Hannestad J., DellaGioia N., Bloch M., The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis, *Neuropsychopharmacology.* 2011 Nov;36(12):2452-9. Epub 2011 Jul 27. DOI: 10.1038/npp.2011.132.
- [145] Kornhuber J., Tripal P., Reichel M., Mühle C., Rhein C., Muehlbacher M., Groemer T.W., Gulbins E., Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications, *Cell Physiol Biochem.* 2010;26(1):9-20. Epub 2010 May 18. DOI: 10.1159/000315101.
- [146] Sacramento PM., Monteiro C., Dias ASO., Kasahara TM., Ferreira TB., Hygino J., Wing AC., Andrade RM., Rueda F., Sales MC., Vasconcelos CC., Bento CAM, Serotonin decreases the production of Th1/Th17 cytokines and elevates the frequency of regulatory CD4+ T cell subsets in multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol.* 2018 Aug;48(8):1376-1388. Epub 2018 Jun 6. DOI: 10.1002/eji.201847525.
- [147] Reed SM., Glick JW., Fluoxetine and reactivation of the herpes simplex virus. *Am J Psychiatry.* 1991 Jul;148(7):949-50.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Grafische Abbildung der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen . . .	10
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung des Sphingolipidstoffwechsels	12
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung der Bildung von L-ASM und S-ASM . . .	15
Abb. 1.4:	Schematische Darstellung zur ASM-Inhibition	22
Abb. 2.1:	Gating-Strategie zur Identifizierung der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen	38
Abb. 2.2:	Gating-Strategie zur Zellsortierung	40
Abb. 3.1:	ASM-Inhibition durch Sertralin und Citalopram in Mäusen	43
Abb. 3.2:	Durchflusszytometrische Darstellung CD4 ⁺ -gegateter Zellen einer Maus bezüglich ihrer Expression von CD25 und Foxp3	44
Abb. 3.3:	Anteil CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ an CD4 ⁺ Zellen nach Zugabe der ASM-Inhibitoren Sertralin und Citalopram	45
Abb. 3.4:	Absolute Zellzahlen an Treg- und Tconv-Zellen nach Kultivierung von Mauszellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Sertralin und Citalopram	46
Abb. 3.5:	ASM-Inhibition durch Sertralin und Citalopram in CD4 ⁺ T-Zellen	47
Abb. 3.6:	ASM-Inhibition durch Sertralin in CD4 ⁺ Tconv- und Treg-Zellen .	48
Abb. 3.7:	Anteil der Treg-Zellen an CD4 ⁺ nach Behandlung mit Sertralin und Citalopram	49
Abb. 3.8:	Absolute Zellzahlen an Treg- und Tconv-Zellen nach Behandlung mit Sertralin	50
Abb. 3.9:	Durchflusszytometrische Abbildung CD4 ⁺ Tconv- und Treg-Zellen nach Behandlung mit Sertralin	52
Abb. 3.10:	%-Treg nach ASM-Inhibition durch Sertralin in Anwesenheit von 0,1 µg/ml αCD3	52
Abb. 3.11:	absolute Zellzahlen nach ASM-Inhibition durch Sertralin in Anwesenheit von 0,1 µg/ml αCD3	53
Abb. 3.12:	MFI CTLA-4 in Treg-Zellen nach Inkubation mit Sertralin	54
Abb. 3.13:	CTLA-4-Expression in T=Zellen	54
Abb. 3.14:	Vergleich der Auswirkung von ASM-Inhibitoren auf die Frequenz regulatorische T-Zellen mit und ohne CD28-Stimulation	55
Abb. 3.15:	Vergleich der Treg-Zellfrequenzen zwischen unsortierten, Gesamt CD4 ⁺ sortierten und CD4 ⁺ CD25 ⁻ sortierten Zellen	57
Abb. 3.16:	Vergleich der Treg-Zellfrequenzen ohne und mit C6-Ceramid	58
Abb. 3.17:	Vergleich der Treg-Zellfrequenzen ohne und mit C6-Ceramid, Säulendiagramm	59
Abb. 3.18:	Prozent regulatorischer T-Zellen nach Zugabe von Sertralin mit und ohne ARC39	61

Abb. 3.19:	Zytokinkonzentrationen ohne und mit Stimulation durch Recall-Antigenen	63
Abb. 3.20:	Zytokinmenge (Td-Stimulation) nach Zugabe von Sertralin	64
Abb. 3.21:	Zytokinmenge (PPD-Stimulation) nach Zugabe von Sertralin	65

Abkürzungsverzeichnis

- AP-1** Aktivator-Protein-1
- APC** Antigen-präsentierende Zelle (Antigen Presenting Cell)
- ASM** Saure Sphingomyelinase (Acid Sphingomyelinase)
- L-ASM** Lysosomale Saure Sphingomyelinase
- S-ASM** Sezernierte Saure Sphingomyelinase
- c** Konzentration
- CD** cluster of differentiation
- CFSE** Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester
- CRS** cytokine release syndrome
- CTL** zytotoxische T-Zelle (Cytotoxic T-Lymphocyte)
- CTLA-4** cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
- ddH₂O** doppelt destilliertes Wasser
- DAG** Diacylglycerol
- DFG** Deutsche Forschungsgesellschaft
- FCS** Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
- FIASMA** Funktioneller Inhibitor der sauren Sphingomyelinase
- Foxp3** forkhead box protein 3
- GITR** glucocorticoide induced necrosis factor
- GSLs** Graduate School of Life Sciences
- HDK** Hohe Dichte Kultur
- HMU-PC** 6-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl-phosphorylcholin
- IFN γ** Interferon γ
- IP3** Inositoltrisphosphat
- IPEX-Syndrom** immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
- LAG-3** lymphocyte activation gene-3
- LDL** low density lipoprotein
- MAPK** Mitogen aktivierte Proteinkinase
- MFI** mediane Fluoreszenzintensität

ml Milliliter
 μ l Mikroliter
MRSA Mehticillin resistenter Staphylococcus aureus
NASH nicht alkoholische Steatohepatitis
NF-AT nuclear factor of activated t cells
NF κ B nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGF Nerven Wachstums Faktor (Nerve Growth Factor)
nmIg Normales Maus IgG
NSM Neutrale Sphingomyelinase
PBMCs Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PKC Proteinkinase C
PPD Purified Protein Derivate
RPM Umdrehungen pro Minute (Rounds Per Minute)
RT Raumtemperatur
sek Sekunde
SSRI selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
STAT signal transducer and activator of transcription
Tconv konventionelle T-Zelle
TCR T-Zell-Rezeptor
Td Tetanus-Diphtherie Toxoid
TH T-Helfer-Zelle
TNF Tumor Nekrose Faktor
Treg regulatorische T-Zelle
nTreg natürliche regulatorische T-Zelle
iTreg induzierte regulatorische T-Zelle

Danksagung

Für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Arbeit und Promotion sowie für die hervorragende Betreuung möchte ich mich zu Beginn vielfach bei meinen beiden Betreuern, Herrn PD Dr. med. Niklas Beyersdorf und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Schneider-Schaulies bedanken. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Mathias Buttman für seine Unterstützung als drittes Mitglied des Thesis Committee der GSLS für meine Arbeit bedanken.

Bei Herrn Christian Linden bedanke ich mich für die Unterstützung in Bezug auf die Zellsortierung.

Der ASM-Inhibitor ARC39 wurde durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Arenz zu Verfügung gestellt, wofür ich mich vielfach bei ihm bedanken möchte.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Dr. rer. nat. Claudia Hollmann für Ihre Beratung und Unterstützung während meiner Einarbeitungsphase im Labor, wodurch es mir schon nach kurzer Zeit möglich war, meine Experimente erfolgreich durchzuführen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich diesbezüglich bei Sandra Werner, Nelli Wolf und Claudia Hahn, sowie Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kerkau.

Weiterhin danken möchte ich auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen AG JSS, AG SSS und AG Beyersdorf für ihre Hilfsbereitschaft und den freundlichen und kollegialen Umgang im Labor.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der DFG (FOR2123/PO2) und der GSLS Würzburg.

Abschließend möchte ich mich noch besonders bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre moralische und seelische Unterstützung bedanken, die mir jederzeit, und insbesondere während des arbeitsintensiven Freisemesters, sehr geholfen hat.