

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie  
der Universität Würzburg

Direktoren: Prof. Dr. med. Lars Dölken / Prof. Dr. Wolfgang Kastenmüller

**Untersuchungen zur selektiven Induktion von Zelltod in  
CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> konventionellen T-Zellen der Maus  
durch Hemmung der sauren Sphingomyelinase *in vitro***

Analysis of the selective induction of cell death in  
murine CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> conventional T cells  
by inhibition of acid sphingomyelinase *in vitro*

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Tom Hühne**

geb. am **06.04.1994** in **Velbert**

Würzburg, April 2021

**Referent:** Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Schneider-Schaulies

**Koreferent:** Prof. Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 22. September 2021

Der Promovend ist Arzt.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation „Untersuchungen zur selektiven Induktion von Zelltod in CD4+ Foxp3- konventionellen T-Zellen der Maus durch Hemmung der sauren Sphingomyelinase *in vitro*“ selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst, andere als die in ihr angegebene Literatur nicht benutzt und dass ich alle ganz oder annähernd übernommenen Textstellen sowie verwendete Grafiken, Tabellen und Auswertungsprogramme kenntlich gemacht habe. Außerdem versichere ich, dass die vorgelegte elektronische mit der schriftlichen Version der Dissertation übereinstimmt und die Abhandlung in dieser oder ähnlicher Form noch nicht anderweitig als Promotionsleistung vorgelegt und bewertet wurde.

Heiligenhaus, 08.04.2021

Ort, Datum

Unterschrift



# Inhalt

1	Einleitung .....	1
1.1	Komponenten des Immunsystems .....	1
1.2	Bildung, Reifung und Aktivierung von T-Zellen.....	2
1.3	T-Zell-abhängige Immunreaktion .....	4
1.3.1	Immunreaktion durch CD4+ T-Zellen .....	5
1.3.2	Bedeutung regulatorischer T-Zellen .....	5
1.4	Sphingolipide.....	7
1.4.1	Klassifizierung und Metabolismus.....	7
1.4.2	Funktion unterschiedlicher Sphingolipid-Derivate .....	9
1.4.3	Saure Sphingomyelinase .....	9
1.5	Trizyklische Antidepressiva.....	10
1.5.1	Wirkmechanismus .....	11
1.5.2	Indikationen und Anwendung .....	12
1.5.3	Nebenwirkungen und Intoxikation.....	12
1.6	Formen des Zelltods .....	13
1.7	Hemmung der Asm und Verschiebung des Verhältnisses von Treg zu Tconv .....	14
2	Zielsetzung.....	15
3	Materialien .....	17
3.1	Versuchstiere .....	17
3.2	Zelllinien .....	17
3.3	Inhibitoren .....	17
3.4	Antikörper.....	17
3.5	Lösungen und Reagenzien.....	18
3.6	Farbstoffe und Kits .....	20
3.7	Geräte.....	20
3.8	Software .....	21
3.9	Verbrauchsmaterial .....	21
4	Methoden .....	22
4.1	Zellbiologische Methoden.....	22
4.1.1	Präparation von Mäusen .....	22
4.1.2	Gewinnung von Zellen aus Milz und Lymphknoten.....	22
4.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	22
4.1.4	Isolierung von CD4+ T-Zellen.....	22

4.1.5	<i>In vitro</i> Kulturen von Lymphozyten in Gegenwart von Asm-Inhibitoren und IL-2 .....	23
4.2	Färbung von CTLL-2 Zellen mit Acridin-Orange.....	23
4.3	Proteinanalyse .....	24
4.3.1	SDS-PAGE und Western Blot.....	25
4.3.2	Immunoblot.....	26
4.4	FACS-Analyse.....	26
5	Ergebnisteil .....	28
5.1	Verhalten der T-Zellpopulationen nach Inhibition der sauren Sphingomyelinase .....	28
5.1.1	Vergleichende Analyse von T-Zell Populationen nach <i>in vitro</i> Behandlung mit Antidepressiva .....	28
5.1.2	Bisphosphonat ARC39 ohne Auswirkung auf T-Zell-Frequenzen .....	30
5.2	IL-2 schützt regulatorische T-Zellen vor dem Zelltod.....	31
5.3	Zelltod konventioneller T-Zellen durch proapoptotisch wirksame Proteine.....	33
5.3.1	Caspasen als möglicher Faktor für Asm-induzierten Zelltod .....	33
5.3.2	HIF-1 $\alpha$ nimmt als zusätzlicher Stressfaktor Einfluss auf das Schicksal der T-Zelle .....	35
5.3.3	Asm-induzierter Zelltod durch Cathepsine .....	38
5.4	Steigerung der lysosomalen Permeabilität durch Inhibition der Asm.....	42
6	Diskussion.....	47
6.1	Asm-Inhibitoren nehmen Einfluss auf das Gleichgewicht von T-Zellpopulationen .....	47
6.2	Zelltod konventioneller T-Zellen durch Asm-Inhibition nicht durch Apoptose zu erklären .. ..	49
6.3	IL-2 schützt regulatorische T-Zellen vor dem Zelltod.....	52
6.4	Hypoxie-induzierte Immunmodulation zugunsten regulatorischer T-Zellen .....	55
7	Zusammenfassung.....	59
8	Summary.....	61
9	Literaturverzeichnis .....	63
10	Appendix .....	71

# 1 Einleitung

## 1.1 Komponenten des Immunsystems

Das Immunsystem besteht aus einem angeborenen und einem erworbenen Anteil. Die angeborene Immunität dient als erste Verteidigungsinstanz des Immunsystems. Humorale und zelluläre Mechanismen lösen eine erste, schnelle Immunreaktion unmittelbar nach Kontakt mit potenziell zu beseitigenden Erregern oder defekten Zellen aus. Typisch für das angeborene Immunsystem ist die sogenannte Mustererkennung (pattern recognition), die Erkennung von erregerspezifischen Molekülgruppen. Zu den humoralen Mechanismen der angeborenen Immunität gehören antibakterielle und virale Substanzen: das Komplementsystem, Lysozym, sowie die Interferone. Bei den zellulären Komponenten werden Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen unterschieden. Natürliche Killerzellen sind in der Lage, Virus-infizierte Zellen und entartete Zellen zu detektieren und zu eliminieren (Neumann, 2008).

Die Komponenten der erworbenen Immunität dienen im Unterschied zum angeborenen Immunsystem zur selektiveren Erkennung erregerspezifischer Moleküle und verstärken die Effektorfunktionen der angeborenen Immunität. Sie bilden eine Zellpopulation von etwa einer Milliarde Lymphozyten, die zwischen Blut und den lymphatischen Organen zirkulieren. Man unterscheidet zwischen B- und T-Lymphozyten, die mit Antigenrezeptoren in bis zu  $10^7$  verschiedenen Spezifitäten ausgestattet sind, damit das spezifische Erkennen von Antigenen möglich ist (Murphy and Weaver, 2018). Ebenso werden Selbstantigen-erkennende B- und T-Zellen eliminiert (zusammengefasst in Sakaguchi *et al.*, 2006; Murphy and Weaver, 2018). Trifft ein passendes Antigen auf einen solchen Rezeptor, kommt es zur Proliferation und Differenzierung der naiven Zelle. Die B-Zelle differenziert sich zur Plasmazelle, die schließlich die Produktion von Immunglobulinen initiiert. T-Lymphozyten entwickeln sich zu zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen. Während zytotoxische T-Zellen infizierte Zellen töten, sezernieren T-Helferzellen spezifische Zytokine, die wiederum andere Zellen wie z.B. B-Zellen und Makrophagen aktivieren. Regulatorische T-Zellen unterdrücken die Aktivität anderer Lymphozyten und verhindern so eine Überschussreaktion des Immunsystems (Murphy and Weaver, 2018).

Eine weitere bedeutende Eigenschaft des erworbenen Immunsystems ist das immunologische Gedächtnis. Dieses sorgt dafür, dass bei erneutem Antigenkontakt die Immunreaktion schneller und stärker abläuft. Diese beschleunigte Reaktion durch Gedächtniszellen kommt durch eine höhere Affinität der Antikörper und Rezeptoren bei der Sekundärreaktion zustande. Hierbei werden vor allem Antikörper der Klassen IgG

und IgA gebildet, anstelle von IgM (und IgG), die vorwiegend nach Erstkontakt mit dem Erreger gebildet werden. Gedächtniszellen werden bei Antigenkontakt neben Effektorzellen gebildet und sind langlebige antigenspezifische Lymphozyten. Hervorzuheben ist, dass sie bereits in der Induktionsphase (siehe Abbildung 1) gebildet werden (Murphy and Weaver, 2018).

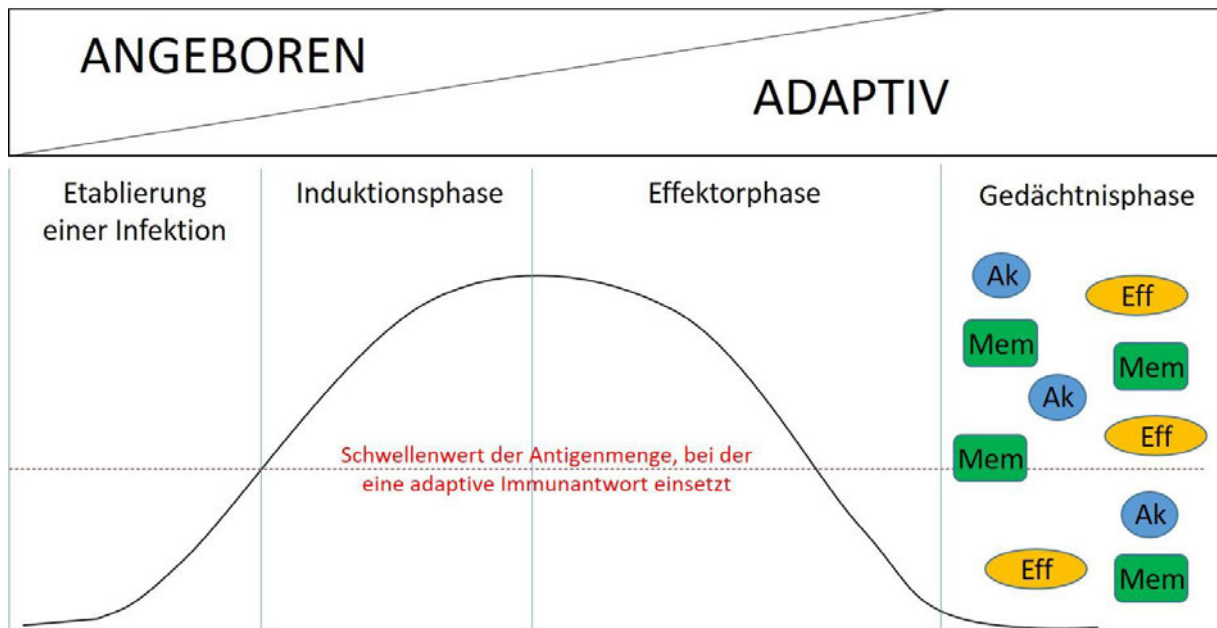


Abbildung 1: Angeborenes und erworbenes Immunsystem

Schematische Darstellung der Dynamik und Phasen einer Immunreaktion. Ak = Antikörper; Eff = Effektorzelle; Mem = Gedächtniszelle. Abbildung verändert nach Murphy and Weaver, 2018.

## 1.2 Bildung, Reifung und Aktivierung von T-Zellen

Das Knochenmark und der Thymus gehören zu den primären lymphatischen Organen. Sie dienen vor allem der Bildung und Reifung von Blutzellen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Im Knochenmark findet die Bildung nahezu aller zellulärer Blutkomponenten statt. Neben der Erythropoese, Thrombozytopoese und Granulozytopoese findet dort die Monozyto- und Lymphopoese statt. Die Lymphopoese der T-Reihe ist geprägt davon, dass Vorläuferzellen aus dem Knochenmark bzw. pränatal aus der fetalen Leber hervorgehen und in kortikale Bereiche des Thymus einwandern. Bestimmte Signale von Thymusepithelzellen aktivieren spezifische Gene für die weitere T-Zell-Prägung (Murphy and Weaver, 2018). Die Thymozyten des Pro-T-Zellstadiums besitzen zunächst keine der später charakteristischen Oberflächenproteine CD4 oder CD8, daher werden sie als doppelt negativ bezeichnet. Durch starke Proliferation kommt es zu somatischen Rekombinationsvorgängen im T-Zell-Rezeptor



(TCR)- $\beta$ -Kettengen, wonach sich die Thymozyten im Prä-T-Zell-Stadium befinden. Im Folgenden wird ein prä-TCR-Komplex auf der Zelloberfläche exprimiert. Dieser löst eine Signalkaskade aus, die die Anlagerung von CD3 und einer  $\alpha$ -Kette bewirkt und zur Vervollständigung des  $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors führt (Neumann, 2008).  $\alpha\beta$ -T-Zellen gehen aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervor. In circa 10% der Fälle wird das TCR $\gamma$ - oder TCR $\delta$ -Gen zuerst exprimiert. Dies führt zur Entwicklung von gewebespezifischen  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Sie werden überwiegend aus Stammzellen der fetalen Leber gebildet (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018).

In der nächsten Differenzierungsstufe exprimieren die Thymozyten die charakteristischen Oberflächenproteine CD4 und CD8. Man bezeichnet sie als doppelt positiv. An den kortikalen Epithelialzellen des Thymus, die MHC-I und MHC-II auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und als antigenpräsentierende Zellen fungieren, findet die Positivselektion statt. Während der Positivselektion entwickeln sich aus doppelt positiven T-Zellen einfach positive CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T-Lymphozyten (Neumann, 2008). Daneben entstehen auch andere Untergruppen wie die regulatorischen T-Zellen, die CD4 und vor allem auch CD25 ( $\alpha$ -Kette des Interleukin-2-Rezeptors) exprimieren. (Murphy and Weaver, 2018).

Die nun einfach positiven Thymozyten migrieren in die Markregion des Thymus, um dort mit dendritischen Zellen in Kontakt zu treten. Diese initiieren die Negativselektion: binden sie mit hoher Affinität an ein körpereigenes Peptid, werden sie durch Apoptose abgebaut. Andernfalls verlassen sie als naive T-Zellen den Thymus und zirkulieren zwischen Blut, Lymphe und sekundären lymphatischen Organen (Neumann, 2008). Auf diese Weise werden bis zu 98% der in Reife befindlichen Thymozyten vor Verlassen des Thymus und nach Überprüfung auf ihre Fähigkeit zur Erkennung von Selbst-Peptiden und zur Selbst-Toleranz aussortiert. Eine Ausnahme der Negativselektion stellen die regulatorischen T-Lymphozyten (Treg) dar. Durch hochaffine Wechselwirkung zwischen TCR und Selbstpeptid-MHC-Komplexen wird diese Linie der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten positiv selektioniert. Diese Prinzip wird auch Agonistenselektion genannt (Murphy and Weaver, 2018).

Die Aktivierung von T-Lymphozyten in der Peripherie setzt voraus, dass naiven T-Zellen Antigene präsentiert werden. Alle reifen CD4-exprimierenden T-Zellen sind in der Lage MHC-II-Molekül-gebundene Peptide zu erkennen. Dadurch wird eine Signaltransduktion initiiert und die weitere Entwicklung zu Zytokin-sezernierenden T-Helferzellen induziert (Murphy and Weaver, 2018). Der Kontakt zwischen Antigen-präsentierenden Zellen (APC), z.B. dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen, und naiven T-Zellen erfolgt

in den sekundären lymphatischen Organen. Dazu gehören Lymphknoten, Milz und das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT = mucosa associated lymphoid tissue). Treffen APC und T-Zelle, die für ein Antigen hochspezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimiert, aufeinander, sorgen Zytokine für eine klonale Expansion: die Proliferation der Antigen-spezifischen T-Lymphozyten. Zudem erfolgt die Differenzierung der naiven T-Zellen in Effektor- und Memory-Lymphozyten (Neumann, 2008).

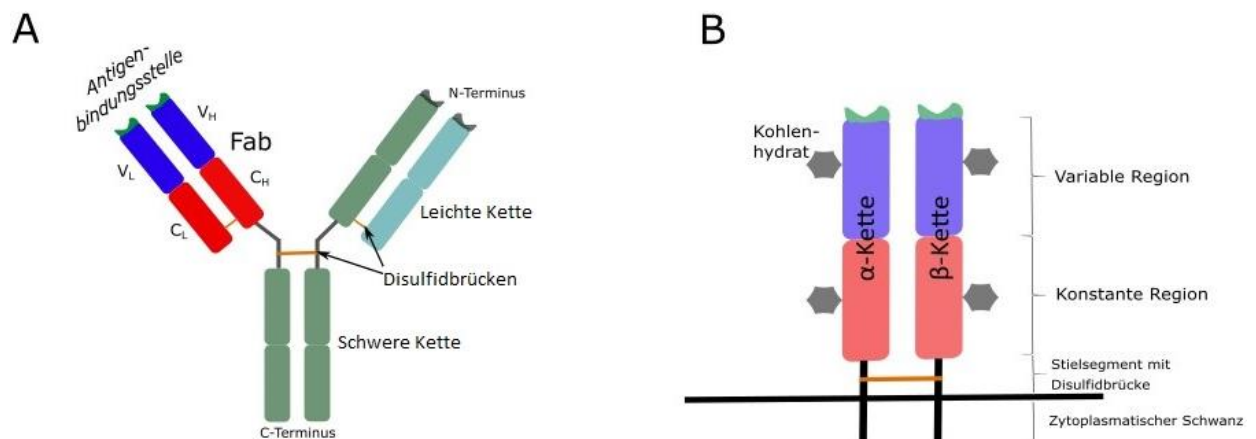


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptor

Schematische Darstellung von (A) Immunglobulinen mit Fc- und Fab-Fragment. Jeder Antikörper besteht aus zwei schweren inneren Ketten und zwei leichten äußeren Ketten, die jeweils durch Disulfidbrücken verbunden sind. Jede Kette beinhaltet eine konstante (C) und eine variable Domäne (V); an der variablen Region binden antigene Strukturen. (B) Schematische Darstellung eines T-Zell-Rezeptors. Auffällig ist die strukturelle Ähnlichkeit zu Immunglobulinen. Er ist ebenfalls ein durch Disulfidbrücken verknüpftes Dimer mit einer konstanten und variablen Domäne, die als Antigenbindestelle fungiert. Äquivalent zum Fab-Teil des Antikörpers besteht der TCR aus den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Transmembranglykoproteinen, die über Wasserstoffbrückenbindungen von Kohlenhydratresten kommunizieren. Abbildung verändert nach Murphy and Weaver, 2018.

### 1.3 T-Zell-abhängige Immunreaktion

Die Antigenerkennung der T-Zellen erfolgt durch ihren T-Zell-Rezeptor (TCR). Seine Struktur und Funktion lässt sich mit der von Immunglobulinen vergleichen (vgl. Abbildung 2) (Murphy and Weaver, 2018).

Erkennt der TCR eine antigene Struktur durch Präsentation von Molekülen des MHC auf Antigen-präsentierenden Zellen, führt dies zur Bildung einer immunologischen Synapse zwischen einer konventionellen CD4+ T-Zelle und einer APC. Sie wird durch präzise

Interaktionen von drei konzentrisch angelegten supramolekularen Aktivierungskomplexen (SMACs) beeinflusst. Im zentralen Komplex (cSMAC) sind der TCR und der Kostimulationsfaktor CD28 konzentriert, während im peripheren SMAC (pSMAC) das Integrin LFA-1 mit seinem Liganden ICAM-1 interagiert. Im distalen Komplex (dSMAC) akkumulieren F-Actin und CD45. Letzteres ist an der Lösung der SMAC beteiligt. Regulatorische T-Zellen, CD8+ T-Zellen und natürliche Killerzellen bilden wiederum andere Interaktionszonen, wie z.B. sekretorische, multifokale oder mobile immunologische Synapsen (zusammengefasst in Beyersdorf and Müller, 2015).

### **1.3.1 Immunreaktion durch CD4+ T-Zellen**

Im Laufe ihrer Entwicklung differenzieren sich CD4+ T-Zellen in weitere Subtypen, die jeweils unterschiedliche Funktionen im Rahmen der Immunantwort übernehmen. Man unterscheidet dabei T-Helfer-Zellen und regulatorische T-Zellen. Die T-Helfer-Zellen werden wiederum unterteilt in  $T_H1$ -,  $T_H2$ -,  $T_H17$ - und folliculäre T-Helferzellen ( $T_{FH}$ ) (Murphy and Weaver, 2018).  $T_H1$ -Zellen sezernieren IL-2 und Interferon- $\gamma$  und stimulieren die zelluläre Immunabwehr (Herold, 2017). Sie sind an der Beseitigung von in Makrophagen überlebenden Mikroorganismen, darunter vor allem Viren, Protozoen und intrazellulären Bakterien, beteiligt (Murphy and Weaver, 2018).  $T_H2$ -Zellen regulieren vorzugsweise die humorale Immunabwehr. Sie stimulieren durch die Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13 eosinophile Granulozyten und Mastzellen und verstärken die Wirkung von IgE (Herold, 2017). Dies befähigt sie zur Elimination von extrazellulären Parasiten (v. a. Helminthen).  $T_H2$ -Zellen sind auch entscheidend an der Pathogenese von Allergien und Asthma beteiligt. Die nach ihrem sezernierten Zytokin IL-17 benannten  $T_H17$ -Zellen stimulieren die Synthese antimikrobieller Peptide und dienen damit dem Aufbau einer epithelialen Barriere im Atem-, Urogenital- und Gastrointestinaltrakt. Sie sind ferner an der Beseitigung von extrazellulären Erregern und Pilzen beteiligt. Die folliculären T-Helferzellen mit den Oberflächenmarkern CXCR5 und PD-1 stellen eine Verbindung zwischen T- und B-Zellen her. Neben  $T_H17$ -Zellen sind auch folliculäre T-Helferzellen zur Produktion von IL-21 befähigt. IL-21 induziert die Affinitätsreifung von Plasmazellen und damit die Produktion von Antikörpern. (zusammengefasst in Deenick and Tangye, 2007; Murphy and Weaver, 2018).

### **1.3.2 Bedeutung regulatorischer T-Zellen**

Regulatorische T-Zellen sind von entscheidender Bedeutung für die Homöostase immunologischer Prozesse und essenziell zur Verhinderung autoimmuner Prozesse. Sie

werden entwicklungsphysiologisch in natürliche (nTreg) und induzierte Treg (iTreg) unterteilt. Während nTreg im Thymus reifen, entstehen iTreg in peripheren lymphatischen Organen aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Charakteristisch für regulatorische T-Zellen ist die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3. Dieser verhindert die Produktion von IL-2, einem T-Zell-Wachstumsfaktor, der Proliferation und Differenzierung von T-Zellen hervorruft und die Stabilität und Funktion von Treg aufrecht erhält (zusammengefasst in Beyersdorf and Müller, 2015). Die von Tregs produzierten Zytokine TGF- $\beta$ , IL-10 und IL-35 hemmen die Entwicklung und Differenzierung sowohl der T<sub>H</sub>1-Zellen als auch der T<sub>H</sub>2-Zellen (zusammengefasst in Dominguez-Villar and Hafler, 2018). Treg-Zellen sind außerdem in der Lage, den Zelltod von Effektorzellen zu induzieren, indem sie Granzym B sezernieren, das durch Perforin-Poren in die Zielzellen gelangt und dort die Aktivierung von Caspasen hervorruft (zusammengefasst in Vignali, Collison and Workman, 2008). Eine physiologische und ausgeglichene Immunantwort ist neben zahlreichen aktivierenden Zytokinen auch auf negative Rückkopplungsmechanismen angewiesen. Dabei unterdrücken eigentliche Effektorzytokine, wie z.B. das durch T<sub>H</sub>1-Zellen gebildete IFN $\gamma$  und das von T<sub>H</sub>2-Zellen gebildete IL-4, die Differenzierung der T<sub>H</sub>17-Zellen. IL-4 hemmt auch die Entwicklung von T<sub>H</sub>1-Zellen, während IFN $\gamma$  T<sub>H</sub>2-Zellen unterdrückt (Murphy and Weaver, 2018). Treg-Zellen exprimieren darüber hinaus konstitutiv CD25 und CTLA-4 (zusammengefasst in Beyersdorf and Müller, 2015). CTLA-4 stellt einen hochaffinen inhibitorischen Rezeptor dar, der die Aktivierung von T-Zellen blockiert, indem er kostimulatorische Liganden von der Oberfläche von APCs mittels Transendozytose eliminiert (Qureshi *et al.*, 2011). CD25 bildet die  $\alpha$ -Kette des heterotrimeren Interleukin-2-Rezeptors. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten des IL-2-Rezeptors sind assoziiert mit JAK1 und 3, die durch Phosphorylierung von Tyrosin Bindungsstellen für die SH2-Domäne des Transkriptionsfaktors STAT5 bilden. STAT5 fördert seinerseits die Gentranskription von c-myc, bcl-2, bcl-x und nicht zuletzt CD25 (Kaltenberg *et al.*, 2010). IL-2 spielt für die Differenzierung, Expansion, Aktivität und die Überlebensfähigkeit von regulatorischen T-Zellen eine entscheidende Rolle. Dabei sind Tregs, die besonders viel CD25 exprimieren, auf die Sekretion von IL-2 durch aktivierte T-Zellen angewiesen. Wird IL-2 von T-Effektor-Zellen gebildet, konkurrieren Tregs mit Effektorzellen um das Zytokin. Einerseits sorgt IL-2 für eine Proliferation der T-Effektor-Zellen, andererseits induziert die Bindung von IL-2 an CD25 von Tregs eine verstärkte Synthese des Transkriptionsfaktors Foxp3. Je mehr IL-2 produziert wird, desto höher ist die

Proliferationsrate regulatorischer T-Zellen (zusammengefasst in Höfer, Krichevsky and Altan-Bonnet, 2012).

Neben dem Verbrauch von IL-2 trägt auch der Verbrauch von ATP zur Suppressivität regulatorischer T-Zellen bei. CD39 ist als Ektonukleotidase durch die Hydrolyse von ATP an der Suppression von T<sub>H</sub>17-Zellen beteiligt. Bei Patienten mit Multipler Sklerose stellte man eine Defizienz von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD39<sup>+</sup> Treg-Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe fest. Das lässt vermuten, dass CD39<sup>+</sup> Treg-Zellen die IL-17-vermittelte pathogene Immunreaktion bei Multipler Sklerose (MS) regulieren (Fletcher *et al.*, 2009). Ein weiterer indirekter Suppressionsmechanismus der Treg-Zellen besteht in der inhibitorischen Wirkung auf Antigen-präsentierende Zellen. Die Reifung dendritischer Zellen wird durch die Expression von LAG3 (lymphocyte activation gene 3) verhindert, indem es an für die T-Zellstimulation obligaten MHC II Moleküle bindet (zusammengefasst in Vignali, Collison and Workman, 2008).

Treg-Zellen verhindern durch diese regulatorischen Mechanismen ein Überschießen der Immunreaktion und die Entstehung von Autoimmunität und terminieren schützende Immunantworten. Sie verhindern, dass für den Organismus potenziell harmlose autoreaktive T-Zellen Autoimmunität erzeugen. So spielt die Aktivität regulatorischer T-Zellen, beispielsweise durch die Sekretion inhibitorischer Zytokine wie IL-10, TGF- $\beta$  und IL-35, auch bei Autoimmunkrankheiten wie Typ-1-Diabetes, Multiple Sklerose, systemischer Lupus erythematoses, Myasthenia gravis und rheumatoide Arthritis eine entscheidende Rolle (zusammengefasst in Dominguez-Villar and Hafler, 2018).

## **1.4 Sphingolipide**

Sphingolipide haben als zentraler Bestandteil lipidhaltiger Zellmembranen nicht nur eine strukturelle Funktion, sondern fungieren darüber hinaus als Signalmoleküle im Rahmen inflammatorischer Prozesse, des induzierten Zelltods, sowie bei Proliferation und Differenzierung. Sie spielen ebenfalls eine Rolle in der Progression von Tumoren, bei COPD, Diabetes und lysosomalen Speicherkrankheiten (zusammengefasst in Airola and Hannun, 2013).

### **1.4.1 Klassifizierung und Metabolismus**

Sphingolipide sind für die Struktur der Zellmembran unerlässlich. Sie enthalten Sphingosin, einen Aminoalkohol mit einer einfach ungesättigten Fettsäure (Murphy and Weaver, 2018). Ausgehend vom Sphingoid-Rückgrat unterscheidet man Ceramide mit einem Acylrest (meist 16 bis 24 C-Atome), Sphingomyelin mit einem Acylrest und einer

Phosphorylcholin-Gruppe sowie Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ohne Acylrest.

Die de-novo-Biosynthese erfolgt mittels der Serinpalmitoyltransferase, die Serin und Palmitat zu 3-Keto-Dihydrosphingosin katalysiert. Durch Reduktion der Carbonylgruppe entsteht Dihydrosphingosin. Die Ceramidsynthese fügt eine Fettsäure durch N-Acylierung hinzu und es entsteht Dihydroceramid. Durch Entsättigung der 4,5-Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung des Sphingoid-Rückgrats entsteht letztlich Ceramid. Sphingomyelin wird durch die saure und neutrale Sphingomyelinase zu Ceramid und Phosphocholin hydrolysiert. Die Ceramidase katalysiert die Reaktion zu Sphingosin, das wiederum durch die Sphingosinkinase zu Sphingosin-1-Phosphat phosphoryliert wird. Ceramid kann durch die Ceramidkinase zu Ceramid-1-Phosphat (C1P) phosphoryliert oder durch Glucosyl- und Galaktosyl-Ceramidsynthasen glykosyliert werden. Sämtliche Schritte sind durch Umkehrreaktionen reversibel. Die Katalyse von S1P zu den Endprodukten Phosphoethanolamin und Hexadecanal durch die S1P-Lyase ist dagegen irreversibel (zusammengefasst in Airola and Hannun, 2013).

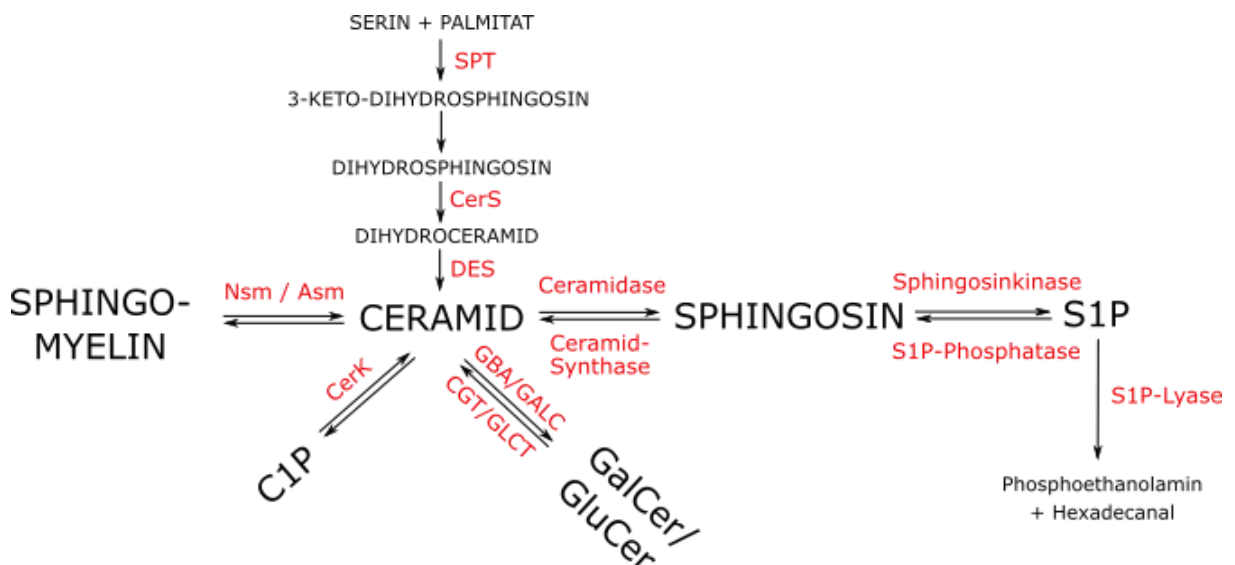


Abbildung 3: Sphingolipid-Metabolismus

Reaktionsdiagramm des Metabolismus von Sphingolipiden. Die vertikale Achse stellt die de-novo-Biosynthese von Ceramiden dar. Die horizontale Achse beschreibt den katalytischen Abbau von Sphingomyelin in seine Endprodukte Phosphoethanolamin und Hexadecanal. Rot dargestellt sind die katalysierenden Enzyme. Abkürzungen: SPT = Serinphosphoryl-Transferase, CerS = (Dihydro)ceramid-Synthase, DES = Dihydroceramid-Desaturase, S1P = Sphingosin-1-Phosphat, Nsm = Neutrale Sphingomyelinase, Asm = saure (acid) Sphingomyelinase, CerK = Ceramid-Kinase, C1P = Ceramid-1-Phosphat, GBA = Glucosylceramidase, GALC = Galaktosyl-

*Ceramidase, GCLT = Ceramid-Glukosyl-Transferase, CGT = Ceramid-Galaktosyl-Transferase. Abbildung verändert nach Airola und Hannun, 2013 und Schneider-Schaulies, 2015.*

#### **1.4.2 Funktion unterschiedlicher Sphingolipid-Derivate**

Die Vielzahl unterschiedlicher Sphingolipide ist für die Struktur der zellulären Plasmamembran ausschlaggebend. Sphingolipide haben darüber hinaus eine Abwehrfunktion gegen Umweltfaktoren und regulieren Entzündungsvorgänge sowie Zelltod und Zellproliferation (zusammengefasst in Airola and Hannun, 2013). In der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit beispielsweise ist eine Erhöhung der Sphingomyelin-Konzentration im Plasma beschrieben (Jiang *et al.*, 2000). Mit einer erhöhten kardialen Mortalität bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) korrelieren unterschiedlich konfigurierte Ceramide, insbesondere ein erhöhtes Verhältnis von C16:0/C24:0, C18:0/C24:0 und C24:1/C24:0 sowie C16:0, C18:0 und C24:1. Um Komplikationen und den Progress einer KHK zu begrenzen, wurden in amerikanischen Labors bereits erste diagnostische Tests etabliert (zusammengefasst in Kurz *et al.*, 2019).

Neben ihrer diagnostischen Bedeutung gewinnen Sphingolipide auch für therapeutische Zwecke an Bedeutung. Die T-Zell-Aktivierung und -Funktion hängt nicht nur von Enzymen und Peptiden ab, sondern auch vom Gehalt unterschiedlicher Lipide wie z.B. Sphingomyelin und Ceramiden in der Zellmembran. Während Ceramide tendenziell proapoptotisch wirken, so unterstützt der Metabolit S1P das Überleben der Wirtszellen (Kirschnek, 2000; zusammengefasst in Beyersdorf and Müller, 2015; zusammengefasst in Schneider-Schaulies and Schneider-Schaulies, 2015) Welche therapeutischen Möglichkeiten dies nach sich zieht, ist Gegenstand aktueller Forschung und wird auch in der vorliegenden Arbeit untersucht.

#### **1.4.3 Saure Sphingomyelinase**

Man unterscheidet generell zwei Enzyme mit pH-abhängiger Aktivität und unterschiedlicher Lokalisation, die die Katalyse von Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin bewirken. Die neutrale Sphingomyelinase ist an der inneren Seite der Plasmamembran lokalisiert (Zhou *et al.*, 2016). Die saure Sphingomyelinase (Asm) existiert in einer membranassoziierten lysosomalen (L-Asm) und einer sekretorischen Form (S-Asm). Während die lysosomale Asm Kationen-unabhängig funktioniert, ist die Aktivität der S-Asm abhängig von Zn<sup>2+</sup>-Ionen (Schissel *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2016). Unterschiedliche Mutationen und Enzymdefekte führen zu einer verringerten Aktivität des Enzyms und bedingen eine Vielzahl von Erkrankungen. Die lysosomale

Speicherkrankheit Niemann-Pick etwa ist eine autosomal-rezessiv vererbte Sphingolipidose, die auf einem Defekt der sauren Sphingomyelinase beruht und zur Akkumulation von Sphingomyelin in Lysosomen von Leber, Milz, Knochenmark und Gehirn führt und neurologische und psychische Symptome sowie Hepatosplenomegalie und interstitielle Lungenbeteiligung verursacht (Lidove *et al.*, 2017). Weiterhin ist eine verringerte Aktivität der Asm beteiligt an Pathomechanismen bei Infektionen und Inflammation, Stoffwechselerkrankungen wie Cystischer Fibrose, dem Morbus Wilson und Diabetes Mellitus Typ 2 sowie an zerebralen Erkrankungen wie z.B. zerebralen Ischämien, Multipler Sklerose, Depression, Morbus Parkinson und Alzheimer (Kirschnek, 2000; zusammengefasst in Bienias *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016).

### **1.5 Trizyklische Antidepressiva**

Interessanterweise sind viele bekannte Asm-Inhibitoren gleichzeitig Antidepressiva. Dazu gehören trizyklische Antidepressiva (TZA) wie z.B. Amitriptylin, oder Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRI) wie z.B. Sertralin (Kornhuber *et al.*, 2013). Da affektiven Störungen unterschiedliche neurobiologische Pathologien zugrunde liegen, sind sie in ihrer Komplexität differenziert zu betrachten. Die am weitesten verbreitete Monoaminmangel-Hypothese besagt, dass die Neurotransmission monoaminergere Strukturen bei affektiven Störungen vermindert ist. Dadurch kommt es zur Dysfunktion zentralnervöser Abläufe. Um diese Dysbalance zu durchbrechen, wird therapeutisch die Konzentration der Monoamine im synaptischen Spalt durch Hemmung der Wiederaufnahme präsynaptisch freigesetzter Neurotransmitter erhöht. Einen anderen Mechanismus machen sich Monoaminoxidasehemmer (MAO-I) zunutze. Sie verhindern den mitochondrialen Abbau von Noradrenalin und Serotonin (5-HT) in den präsynaptischen Axonenden und steigern damit den Gehalt in den Speichervesikeln und damit die Freisetzung in den synaptischen Spalt (Aktories *et al.*, 2017).

Neben der Monoaminmangel-Hypothese werden eine Beeinflussung der Neuromodulation durch einen Mangel neurotropher Faktoren und der Einfluss von Corticosteroidrezeptoren diskutiert. Beim Einsatz des NMDA-Antagonisten Ketamin mit seinem aktiven Metaboliten Hydroxynorketamin stellte man eine antidepressive Wirkung fest. Diese Erkenntnis stützt sich auf die Glutamat-Hypothese der Depression und befindet sich aktuell in klinischer Erprobung (Aktories *et al.*, 2017; Lumsden *et al.*, 2019). Dies soll verdeutlichen, dass der Formenkreis der affektiven Störung weitaus komplexer ist als die Erklärung durch einen Mangel an Neurotransmittern. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird diese hier jedoch als Haupttheorie dargelegt.



### 1.5.1 Wirkmechanismus

Ziel der meisten Antidepressiva ist es, die Konzentration von Noradrenalin und/oder Serotonin im synaptischen Spalt zu erhöhen, indem entweder der Abbau unterdrückt (MAO-Hemmer) oder die Wiederaufnahme gehemmt wird (trizyklische Antidepressiva, TZA, und selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitoren, SSRI). TZA gehören zur Gruppe der nichtselektiven Monoamin-Rückaufnahme-Inhibitoren. Ihren Namen erhielten sie aufgrund ihrer Drei-Ring-Struktur. TZA unterscheiden sich durch Veränderungen an ihrem Zentralring bzw. an einer Seitenkette. Stützend auf der Monoaminmangel-Hypothese (Aktories *et al.*, 2017) besteht bei affektiven Störungen, z.B. Depressionen, eine ungenügende Konzentration an exzitatorischen Neurotransmittern. Durch Hemmung der Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt erhöht sich dementsprechend die Neurotransmission. SSRI, SNRI (Serotonin-Noradrenalin-Reuptake-Inhibitor) und eben auch TZA machen sich diesen Blockademechanismus der Neurotransmitter-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran zunutze (Karow and Lang-Roth, 2017). Das Nebenwirkungsprofil unterschiedlicher Wirkstoffe variiert je nach Affinität zu den jeweiligen Transportern. So hemmen Desipramin und der aktive Metabolit von Amitriptylin (Nortriptylin) die Noradrenalinaufnahme aus dem synaptischen Spalt und steigern darüber hinaus den Antrieb ausgeprägter als andere Substanzen. Clomipramin dagegen präferiert den 5-HT-Rezeptor und wirkt somit anxiolytisch. Bei Depressionen mit Antriebshemmung wird Amitriptylin beispielsweise bevorzugt eingesetzt, bei Depressionen mit Suizidgefährdung ist dieser Wirkstoff hingegen kontraindiziert. (Aktories *et al.*, 2017).

Neben der namensgebenden antidepressiven, stimmungsaufhellenden Wirkung haben TZA auch weitere Wirkungsspektren. So werden sie auch bei Phobien, Angst- und Panikstörungen sowie bei Zwangsstörungen eingesetzt und wirken koanalgetisch. Analog zu Neuroleptika sedieren TZA bei akutem Einsatz bereits ab der ersten Woche, was vor allem die Suizidgefährdung positiv beeinflusst. Ab der zweiten Woche wirken sie jedoch thymoretisch (antriebssteigernd), wodurch die Suizidgefahr wiederum ansteigt. Dieses Zeitfenster muss bei akuter Selbstgefährdung der Patienten durch eine stationäre Überwachung überbrückt werden. Die eigentliche antidepressive, thymoleptische (stimmungsaufhellende, depressionslösende) Wirkung entfaltet sich erst bei Dauergabe von TZA nach circa drei Wochen. Dabei ist zu betonen, dass hier lediglich eine Stimmungsdysbalance ausgeglichen werden kann und die Entwicklung einer Manie in der Regel nicht getriggert wird.

Die langfristige Gabe von Antidepressiva führt außerdem nachhaltig zu Veränderungen zentralnervöser Rezeptoren. Es findet eine Herabregulierung zentraler  $\beta$ -Rezeptoren und eine Aktivierung postsynaptischer  $\alpha$ -Rezeptoren statt. Außerdem wird die GABAerge Aktivität im Frontalhirn verstärkt (Karow and Lang-Roth, 2017).

Unter Dauergabe kommt es bei zahlreichen Antidepressiva zu einer Desensibilisierung präsynaptischer Autorezeptoren und postsynaptisch zu einer Modulation mit anhaltender Veränderung der monoaminergen Neurotransmission (Karow and Lang-Roth, 2017).

### **1.5.2 Indikationen und Anwendung**

Der Name lässt vermuten, dass TZA vor allem bei Depressionen eingesetzt werden. Diese nicht-selektiven Monoamin-Wiederaufnahmehemmer sind heutzutage jedoch nur noch zweite Wahl bei endogenen Depressionen. Bevorzugt werden SSRI, Venlafaxin und Mirtazapin eingesetzt (Karow and Lang-Roth, 2017). Generell wird die Auswahl des Antidepressivums vor allem dadurch bestimmt, ob eine sedierende oder antriebssteigernde Wirkung erzielt werden soll. Vor allem bei Depressionen mit Unruhezuständen ist die Substanzgruppe des Amitriptylin-Typs, darunter Amitriptylin, Trimipramin und Doxepin mit stark sedierender Wirkung indiziert. Substanzen des Amitriptylin-Typs sowie des Imipramin-Typs werden als Ko-Analgetika der Schmerztherapie eingesetzt (Amboss, 2019). Imipramin wurde 1958 als erstes Antidepressivum eingeführt (Amboss, 2019). Der Desipramin-Typ wurde zwar in Deutschland aufgrund plötzlicher ungeklärter Todesfälle vom Markt genommen, pharmakologisch ähnliche Medikamente wie z.B. Nortriptylin werden aufgrund ihres ähnlichen Wirkungsprofils, darunter vor allem einer Antriebssteigerung, jedoch weiter verschrieben (Amboss, 2019).

Da ein antidepressiver Effekt sich erst nach circa zwei bis drei Wochen einstellt, müssen TZA in der Regel über einen längeren Zeitraum eingenommen werden. Um einen relativen Monoamin-Mangel nach Absetzen der Medikation zu vermeiden, sollte auch nach Überwinden der depressiven Phase die Einnahme der Antidepressiva fortgeführt werden, um einem Rezidiv vorzubeugen. Bei Langzeitanwendung stellen sich mit der Zeit außerdem negative Effekte (siehe 1.5.3) ein, wobei die antidepressive Wirkung bestehen bleibt (*Trizyklische Antidepressiva - DocCheck Flexikon*, 2019).

### **1.5.3 Nebenwirkungen und Intoxikation**

TZA bedienen sich nicht nur der Inhibition der Wiederaufnahme von Noradrenalin aus dem synaptischen Spalt in die Zelle, sondern besitzen darüberhinaus eine direkte  $\alpha$ -

adrenerg blockierende Wirkung und wirken membranstabilisierend am Myokard, woraus sich eine Reihe von Nebenwirkungen ableitet. Klinisch bedeutsam ist in erster Linie die anticholinerge Wirkung der TZA. Patienten beklagen trockene Schleimhäute und Verschwommensehen. Es kommt zur Pupillendilatation, zur Harnretention und kann bis zum toxischen Megakolon mit Darmperforation und Ileus führen. Außerdem sind ZNS-Symptome wie Krämpfe, positive Pyramidenbahnzeichen, Rigidität, Delir sowie Myoklonien und respiratorische Insuffizienz mit daraus folgender azidotischen Stoffwechsellage beschrieben. Bei höheren Dosen kann eine kardiovaskuläre Wirkung der TZA klinisch dominieren. Sinustachykardien, Reizweiterleitungsstörungen in Form von Long-QT-Syndrom, ST-Hebung und -senkung bis hin zum kardiogenen Schock mit Kammerflimmern, Hypotension und Asystolie sind möglich. Eine Dosisanpassung ist sowohl bei Nieren- als auch bei Leberfunktionsstörungen zu beachten: nach der Konjugation in der Leber werden TZA über die Niere ausgeschieden (zusammengefasst in Kerr, McGuffie and Wilkie, 2001; *Trizyklische Antidepressiva - DocCheck Flexikon*, 2019; Amboss, 2019).

## **1.6 Formen des Zelltods**

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods, welche ohne entzündliche Prozesse verläuft. Die Zellbestandteile werden dabei vesikulär abgebaut. Es kommt zum Abbau der Kern-DNA, der Degeneration und Kondensation des Zellkerns sowie zur Phagozytose der Organellen und übrigen Kompartimente, um die Zelle letztlich gänzlich aus dem Kreislauf zu entfernen. Gerade während der Proliferation und Differenzierung von sich schnell teilenden Zellen wie z.B. in der Schleimhaut des Gastrointestinal- oder Urogenitaltrakts, aber auch bei der Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten kommt es zu hohen Apoptoseraten, um den Organismus vor pathologischen Mutationen zu schützen. Die Induktion der Apoptose verläuft auf intrinsischem oder extrinsischem Weg, welche miteinander in Verbindung stehen. Beim intrinsischen Apoptoseweg wird durch exekutorische Proteine (Bax, Bak, Bok) Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt. Cytochrom c bindet an Apaf-1 und bildet gemeinsam mit der Procaspase 9 ein oligomeres Apoptosom. Dieses aktiviert die Caspase 3, welche wiederum weitere Caspasen (6 und 9) aktiviert. Letztendlich kommt es zur Aktivierung von Caspase-aktivierten DNasen (CAD), welche die Spaltung der DNA aktivieren und den Abbau der Zellbestandteile zur Folge haben. Der extrinsische Weg wird durch die Aktivierung von Todesrezeptoren eingeleitet. Während die Endstrecke des intrinsischen Wegs über die Caspase 9 verläuft, starten die Caspasen 8 und 10 die nachfolgende extrinsische

Caspasekaskade (Murphy and Weaver, 2018). Neben dem in- und extrinsischen Weg existiert zusätzlich eine T-Zell-vermittelte Apoptose, welche abhängig von Perforin und Granzym A und B ist (zusammengefasst in Elmore, 2007).

Im Gegensatz zur Apoptose kommt es bei der Nekrose zur lokalen Entzündung ausgelöst durch physikalische oder chemische Verletzungen (Murphy and Weaver, 2018). Morphologisch kommt es zur Zellschwellung, zur Ausbildung zytoplasmatischer Vakuolen und zur Ruptur von Organellen und Plasmamembranen, was die Ausschüttung inflammatorischer zytoplasmatischer Stoffe zur Folge hat (zusammengefasst in Elmore, 2007). So basiert das akute Koronarsyndrom beispielsweise auf nekrotischen Prozessen infolge einer Membranschädigung (Murphy and Weaver, 2018). Die Abgrenzung von Nekrose und Apoptose ist jedoch fließend. Kommt es im Rahmen von Apoptose zum Mangel an Caspasen oder intrazellulärem ATP, so sind auch nekrotische Prozesse am Tod der Zelle beteiligt. Weiterhin beeinflussen Gewebe, Entwicklungsstadium sowie weitere Faktoren das Schicksal der Zelle (zusammengefasst in Elmore, 2007).

### **1.7 Hemmung der Asm und Verschiebung des Verhältnisses von Treg zu Tconv**

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Asm an der Entstehung von Depressionen beteiligt ist (Kornhuber *et al.*, 2005; Gulbins *et al.*, 2013, 2015). Verschiedene TZA wie Amitriptylin oder Desipramin und einige SSRI, darunter Sertralin oder Citalopram, haben einen positiven therapeutischen Effekt auf Patientinnen und Patienten mit Depressionen und hemmen die saure Sphingomyelinase (Asm) in unterschiedlichem Maße (Kornhuber *et al.*, 2008, 2009, 2013). Ob es zwischen diesen zwei Beobachtungen einen kausalen Zusammenhang gibt, wird aktuell erforscht. Interessanterweise hat die Asm-Aktivität auch Auswirkungen auf T-Zellpopulationen. So wurde von unserer Arbeitsgruppe beschrieben, dass die Defizienz und auch die pharmakologische Hemmung der Asm die Frequenz regulatorischer T-Zellen der Maus durch selektiv induzierten Zelltod konventioneller T-Zellen erhöht (Hollmann *et al.*, 2016). Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht bekannt. Außerdem unterscheiden sich Treg-Zellen in einer höheren basalen Asm-Aktivität und einer niedrigeren Lipidordnung im Vergleich zu Tconv-Zellen. Weiterhin führt die Asm-Defizienz in Treg Zellen zu einer erhöhten Umsatzrate des immunsupprimierenden Moleküls CTLA-4. Insgesamt tragen diese Mechanismen zu einer verstärkten Suppressivität von Treg Zellen aus Asm-defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp Zellen bei. Dies wurde anhand eines Maserninfektionsmodells deutlich. Hierbei wurde beobachtet, dass die Kontrolle

der Masernvirusinfektion bei Asm-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich schlechter war. Weniger masernspezifische T-Zellen in der akuten Phase der Maserninfektion führen zur Erhöhung der Viruslast, während in der chronischen Phase die Anzahl und Frequenz regulatorischer T-Zellen erhöht war und sich in einer verstärkten Maserninfektion widerspiegelte (Hollmann *et al.*, 2016). Interessanterweise können neben der Asm-Aktivität auch entzündliche Reaktionen (Rook and Lowry, 2008) und regulatorische T-Zellen (Li *et al.*, 2010) an der Entstehung und dem Verlauf bestimmter Formen der Depression beteiligt sein.

## 2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte die selektive Induktion des Zelltods durch Hemmung der sauren Sphingomyelinase in CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> konventionellen T-Zellen der Maus *in vitro* analysiert werden. Es sollte untersucht werden, auf welchem Mechanismus der Zelltod konventioneller T-Zellen nach pharmakologischer Asm-Inhibition beruht. Experimente sollten zeigen, inwiefern die lysosomale Membranintegrität durch die Asm-Inhibition beeinflusst wird. Die Nullhypothese besagte, dass eine durch Asm-Inhibition induzierte Steigerung der lysosomalen Membranpermeabilität (LMP) proapoptotisch wirksame Proteine sowie Lipide ins Zytosol freisetzen und den Zelltod auslösen könnte (zusammengefasst in Repnik *et al.*, 2012). Insgesamt bestimmt das Gleichgewicht zwischen protektiven und zelltod-auslösenden Faktoren das Schicksal der T-Zelle. Dahingehend sollte der Einfluss von IL-2 und STAT5 als protektive Faktoren für regulatorische T-Zellen untersucht werden. Weitergehend wurde der Einfluss von Hypoxie als Stressfaktor auf die Vitalität von T-Zellen analysiert. Einen grafischen Überblick über die Zusammenhänge der hier untersuchten Fragestellungen gibt die Abbildung 4. Die Beobachtung der das Zellschicksal bestimmenden Determinanten, die entweder das Überleben oder den Zelltod einer Zelle beeinflussen, könnte wegweisend sein für die Erforschung neuer Immuntherapiekonzepte und eine weitaus vielfältigere Nutzung bereits bestehender Therapien.

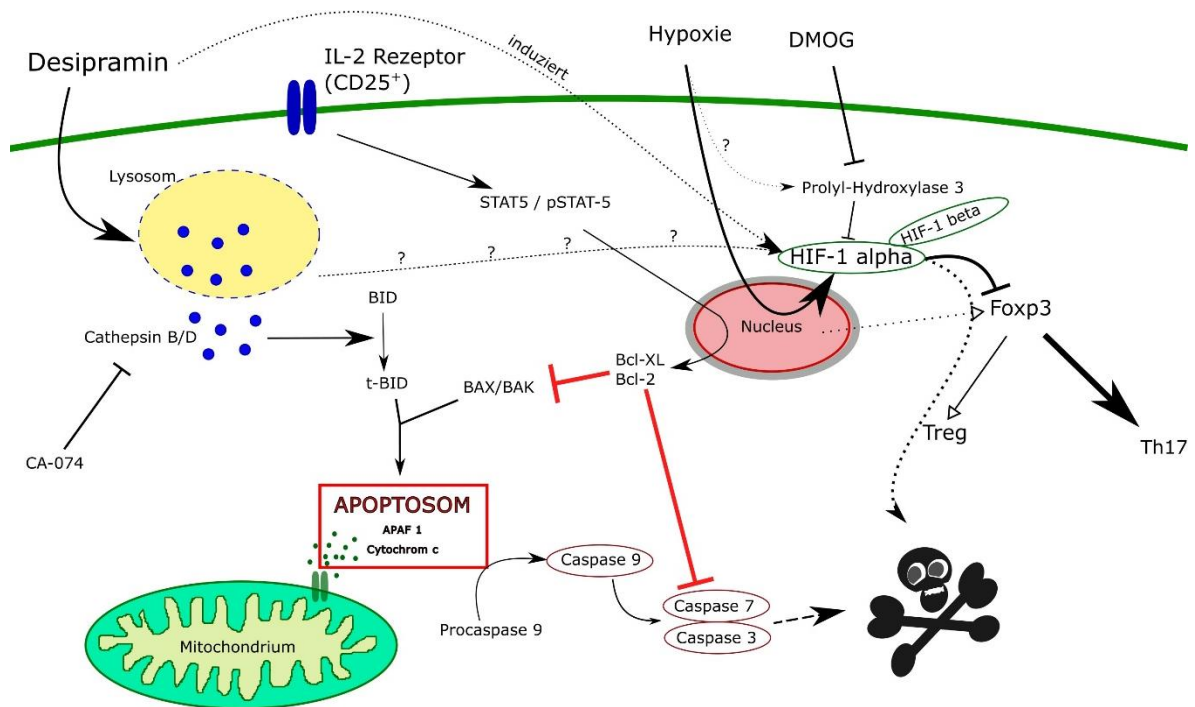


Abbildung 4: Zusammenhang zwischen ASM-Inhibition und HIF-1 $\alpha$  Aktivierung in vitro

Asm-Inhibitoren wie z.B. Desipramin induzieren die Ablösung der Asm und der sauren Ceramidase von der inneren Membran des Lysosoms und ihren anschließenden Abbau. Dies führt zu einer Akkumulation von Sphingomyelin und zur Erhöhung der lysosomalen Membranpermeabilität. Die Permeabilitätssteigerung führt möglicherweise zur Freisetzung von Cathepsinen, die eine komplexe caspase-abhängige Signalkaskade auslösen, die zur Induktion von Apoptose führt. Der IL-2-Rezeptor sorgt über Signaltransduktionsmoleküle wie STAT5 für eine Aktivierung Bcl-Proteinfamilie, die zur Inhibition von Caspasen führen und letztlich die Apoptose verhindern. Hypoxie bzw. die Inhibition der Prolylhydroxylase 3 (PHD3) führt zur Expression von Hypoxie induzierbarem Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), welches die Expression von FoXP3 und damit die Differenzierung von Treg-Zellen verhindert. Die möglichen Zusammenhänge zwischen Asm-Hemmung, induziertem Zelltod konventioneller T-Zellen, IL-2-Effekten und Hypoxie-bedingten Effekten auf das T-Zell-Gleichgewicht sollten in geeigneten Zelllinien und Zellen aus Mäusen untersucht werden. Angelehnt an Singh et al., 2016 und Schneider-Schaulies and Schneider-Schaulies, 2015.

### 3 Materialien

#### 3.1 Versuchstiere

Wildtypische Mäuse	Hauszucht des Instituts für Virologie und Immunbiologie Würzburg
Transgene STAT5 Mäuse	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Richard Moriggl, Ludwig Boltzmann Institut Wien
CD4Cre HIF-1 $\alpha$ flox/flox Mäuse	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der AG Zernecke-Madsen (Experimentelle Biomedizin II, Würzburg)

#### 3.2 Zelllinien

CTLL-2	ATCC® TIB-214™	Klon aus C57BL/6 Mäusen
--------	----------------	-------------------------

#### 3.3 Inhibitoren

Desipramin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Sertralin	
ARC39	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. C. Arenz, Berlin
CA-074	Sigma-Aldrich
Z-VAD-FMK	Invivogen (San Diego)

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Inhibitoren

#### 3.4 Antikörper

Spezifität	Konjugat	Klon	Isotyp	Hersteller	Verdünnung
CD4	BV 421	GK1.5	Ratte IgG2b, $\kappa$	Biologend	1:750
CD25	PE	7D4	Ratte IgM $\kappa$	Miltenyi	1:50
CD152 (CTLA-4)	PE-Cy7	UC10-4B9	Armenischer Hamster IgG	Biologend	1:250
Foxp3	PerCP-Cy5.5	FJK-I6S	Anti mouse/rat	eBioscience	1:300
Viability dye	eFluor 780			eBioscience	1:1000

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antikörper

Spezifität	Ursprung	Klon	Hersteller	Dilution
Anti-Cathepsin B	Rabbit	polyklonal	Cell Signaling Technology #3383	1:1000
Anti-Cathepsin B	mouse	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology sc-365558	1:1000
Anti-Cathepsin D	Rabbit	polyklonal	Cell Signaling Technology #2284	1:1000
Anti-GAPDH	Rabbit	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology sc-25778	1:10.000
Anti-Beta-Actin	Rabbit	monoklonal	Cell Signaling Technology #8457	1:10.000
Anti-Rabbit HRP IgG	Goat	monoklonal	Cell Signaling Technology #7074S	1:10.000
Anti-Mouse HRP IgG	Horse	monoklonal	Cell Signaling Technology #7076S	1:10.000
Anti-rabbit Alexa 647	Donkey	polyklonal	Biolegend, 406414	1:10.000

Tabelle 3: Übersicht über verwendete Westernblot-Antikörper

### 3.5 Lösungen und Reagenzien

Medium/Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Ammoniumpersulfat (10%)		Sigma Aldrich
Anoden Puffer 300mM	0,3M Tris base, 20% Methanol, gelöst in ddH <sub>2</sub> O, ph=10,4	
Anoden Puffer 30mM	0,025M Tris base, 20% Methanol, gelöst in ddH <sub>2</sub> O, pH=10,4	
Bisacrylamid (4K acryl amide solution (30% - Mix 37,5:1)		AppliChem
Rinderserumalbumin (BSA)		AppliChem
BSS (Balanced Salt Solution I,II)	BSS I: 50g Glucose, 3g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 11,9g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5g Phenolrot ad 5L ddH <sub>2</sub> O BSS II: 9,25g CaCl <sub>2</sub> , 20g KCl, 320g NaCl, 10g MgCl <sub>2</sub> , 10g MgSO <sub>4</sub> ad 5L ddH <sub>2</sub> O	Medienküche des Instituts für Virologie und Immunbiologie



	125ml BSS I mit 125ml BSS II mischen ad 1L ddH <sub>2</sub> O	
BSS/BSA	BSS Lösung mit 0,2% BSA	Medienküche des Instituts für Virologie und Immunbiologie
DMSO		AppliChem
FACS-Puffer	0,1% BSA, 0,02% Natriumazid ad 1L PBS	Medienküche des Instituts für Virologie und Immunbiologie
Fetales Kälberserum (FCS)		Biochrom
5% fettfreie Trockenmilch	5% low fat milk powder, ad 100ml PBS	
Kathoden Puffer	0,025M Tris base, 5,2g Hexonsäurepulver, 20% Methanol, gelöst in ddH <sub>2</sub> O, ph=9,4	
5X Lammeli Puffer	10% SDS, 250mM Tris.HCl (pH=8,0), 50% Glycerol, 500mM Dithiothreitol (DTT), 0,25% Bromophenol blau, gelöst in ddH <sub>2</sub> O	
Mausmedium	RPMI 1640 Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 2mM Glutamin, 10mM HEPES, 50uM 2-Mercaptoethanol, 100ug/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin	Gibco by lifetechnologies
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	138mM NaCl, 2,7mM KCl, 6,5mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,9mM CaCl <sub>2</sub> , 0,5mM MgCl <sub>2</sub> , ph=7,4 einstellen	Medienküche des Instituts für Virologie und Immunbiologie
PBS-T	1L PBS (-CaCl <sub>2</sub> , -MgCl <sub>2</sub> ), 0,05% Tween-20	
Physiolog. Kochsalzlösung	1,8% NaCl: 1,8g NaCl auf 1L ddH <sub>2</sub> O	
Proleukin (rekombinantes humanes IL-2)		Novartis (Basel, Schweiz)
10X Protein Gel Puffer	1,44% Glycin, 0,303% Tris base, 0,1% SDS, gelöst in ddH <sub>2</sub> O pH=6,8	

Sammelgel	1,5M Tris.Cl pH 6,7, 12,4% 4K Bisacrylamid, 0,2% Ammoniumpersulfat, 1% SDS, 0,25% TEMED, 74,95% ddH <sub>2</sub> O	
SDS (20%)		AppliChem
Tetramethylethyldiamin (TEMED)		Sigma Aldrich
Trenngel	1,5M Tris.Cl pH 8,7, 30% 4K Bisacrylamid, 0,2% Ammoniumpersulfat, 1% SDS, 0,25% TEMED, 22,25% ddH <sub>2</sub> O	
Tris		AppliChem
Trypanblau	0,04% Trypanblau mit 0,05% Natriumazid in PBS	AppliChem
T-STIM (IL-2 Supplement)	T-Cell Culture supplement mit conA	Becton Dickinson
Tween®-20		Roth (Karlsruhe)

*Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Lösungen und Reagenzien*

### 3.6 Farbstoffe und Kits

Acridin Orange (AO)	Sigma-Aldrich
CD4 Isolationskit Affimetrix	Santa Clara (Kalifornien)
FemtoMax Super Sensitive Chemilum. HRP Substrate Luminol	Rockland (Pennsylvania)
FemtoMax Super Sensitive Chemilum. HRP Substrate Reaction Buffer	Rockland (Pennsylvania)
Perm/Wash-Puffer	BectonDickinson (Heidelberg)

*Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Farbstoffe und Kits*

### 3.7 Geräte

Analysenwaage	A. Hartenstein (Würzburg)
Biofuge pico	Heraeus (Gera)
Brutschrank	Heraeus (Gera)
FACS LSR II	Becton Dickinson (Heidelberg)
Konfokalmikroskop	Zeiss LSM 780 (Oberkochen)
Lichtmikroskop	Leica DMLS (Wetzlar)
Magnetrührer	IKA-Labortechnik (Staufen)

Multipipette	Eppendorf (Hamburg)
Neubauer Zählkammer	A. Hartenstein (Würzburg)
Präparationsbesteck	A. Hartenstein (Würzburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
SDS-Gelelektrophoresekammer	Institutswerkstatt
Sterilwerkbank	Thermo Fisher (Steingrund)
Tischzentrifuge	Heraeus (Gera)
Ultrazentrifuge	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Vortex VTX-3000L	A. Hartenstein (Würzburg)
Wasserbad	A. Hartenstein (Würzburg)
Westernblot-Entwicklung LI-COR Odyssey Fc	LI-COR (Bad Homburg)
Zentrifuge	Hettich (Tuttlingen)

### 3.8 Software

FlowJo v8.8.7	FACS Datenanalyse Software
Graphpad Prism	Statistiksoftware
Microsoft Excel 2013	Statistiksoftware
Microsoft Word 2013	Textverarbeitung
Mendeley	Literaturverwaltung
ZEN2012	Konfokalmikroskopie

### 3.9 Verbrauchsmaterial

Einmal-Spritzen BD Plastikpack	A. Hartenstein (Würzburg)
Deckgläser	A. Hartenstein (Würzburg)
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg)
15ml/50ml Greiner Falcon	bio-one (Frickenhausen)
Mikrotiterplatten	Greiner Labortechnik (Frickenh.)
Nitrocellulose Membran	A. Hartenstein (Würzburg)
Nylonsieb 70µm	Becton Dickinson (Heidelberg)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Petrischalen	Greiner Labortechnik (Frickenh.)
Pipettenspitzen	A. Hartenstein (Würzburg)
Whatman-Blottingpapier	A. Hartenstein (Würzburg)
Zellkulturflaschen	bio-one (Frickenhausen)
Zentrifugenröhrchen	A. Hartenstein (Würzburg)

## 4 Methoden

### 4.1 Zellbiologische Methoden

#### 4.1.1 Präparation von Mäusen

Die zu untersuchenden Mäuse wurden mit CO<sub>2</sub> getötet. Das Eintreten des Todes wurde durch Überprüfung der Vitalreflexe (Kornealreflex und Zwischenzehreflex) gesichert. Zur Präparation wurde die Maus in Rückenlage an ihren Extremitäten auf einem Styroporbrett mit Nadeln festgesteckt und das Bauchfell mit Terralin desinfiziert. Das Fell wurde auf der anatomischen Medianlinie von oral nach distal bis zum Schwanz aufgeschnitten und Entlastungsschnitte an Armen und Beinen durchgeführt. Anschließend erfolgte die Eröffnung des Peritoneums. Nach Wegklappen des Darms nach sinister wurden mesenteriale sowie zervikale und axilläre Lymphknoten und die Milz präpariert. Lymphknoten und Milz wurden separat oder gepoolt in sterile Petrischalen mit kaltem BSS/BSA-Medium überführt.

#### 4.1.2 Gewinnung von Zellen aus Milz und Lymphknoten

Die präparierten Organe wurden mittels 40µm-Plastiksieb und Spritzenstempel in einer Petrischale zerrieben und die Zellsuspension in 50ml Röhrchen überführt. Nach einem Waschschrift mit BSS/BSA (Zentrifugation bei 190g für 5min) wurde bei den Milzzellen eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Hierzu wurden nacheinander 3ml ddH<sub>2</sub>O und 3ml 1,8% NaCl unter Vortexen zugefügt, sodass es zum hypoosmolaren Schock bei den kernlosen Erythrozyten kam.

#### 4.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die zu analysierenden Zellen wurden mittels Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Dazu wurden 100µl der Zellsuspension je nach geschätzter Zellzahl 1:5, 1:10 oder 1:20 mit 0,04% Trypanblau angefärbt. 10µl der angefärbten Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Es wurden die hell leuchtenden, lebenden Zellen innerhalb der vier 16er-Quadrate gezählt und ein Mittelwert gebildet. Die Zellzahl berechnete sich schließlich anhand folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

#### 4.1.4 Isolierung von CD4+ T-Zellen

Aus den Lymphozyten wurden CD4+ T-Zellen mittels dem „MagniSort™ Mouse CD4 T cell Enrichment Kit“ der Firma Affimetrix isoliert. Es wurden stets 50% der vom Hersteller

empfohlenen Mengen verwendet, da Testmessungen am FACS unter diesen Bedingungen eine suffiziente Isolation der CD4+ Zellfraktion gezeigt haben.

Die Zellsuspension wurde in sterile FACS-Tubes überführt und bei 190g zentrifugiert. Pro  $10^7$  Zellen wurden 50 $\mu$ l BSS/BSA und 10 $\mu$ l Biotin Antikörper-Mix zugefügt und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift mit BSS/BSA wurden pro  $10^7$  Zellen 50 $\mu$ l BSS/BSA und 10 $\mu$ l magnetische anti-Biotin Beads zugefügt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Volumen in den Tubes auf 2,5ml erhöht, die Zellen durch vorsichtiges Resuspendieren gleichmäßig verteilt und die Tubes für 5min in einen Magneten gestellt. Die CD4-negativen Zellen verblieben am Magneten gebunden, während die CD4-positiven T-Zellen aus dem Tube in ein 15ml Falcon überführt und quantifiziert werden konnten.

#### **4.1.5 *In vitro* Kulturen von Lymphozyten in Gegenwart von Asm-Inhibitoren und IL-2**

Zur Analyse von T-Zell-Frequenzen und bestimmten Proteinen wurden jeweils  $2 \times 10^5$  Lymphozyten (gesamt) aus Milz und Lymphknoten in einer 96-Well Rundbodenplatte in Mausmedium ausgesät. Die Zellen wurden in Anwesenheit (0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M) und Abwesenheit von IL-2 sowie mit den eingesetzten Asm-Inhibitoren (z.B. Desipramin, Sertralin) in unterschiedlichen Konzentrationen (von 0 $\mu$ M bis 10 $\mu$ M) für drei Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Zur Proteinanalyse wurden jeweils  $10^7$  CD4+ Lymphknoten in einer 6-Well Flachbodenplatte in Mausmedium ausgesät und für nur 24 Stunden unter den gleichen Voraussetzungen inkubiert.

#### **4.2 Färbung von CTLL-2 Zellen mit Acridin-Orange**

Acridin-Orange (AO) ist ein Farbstoff, der zur Untersuchung der Stabilität von Lysosomen in lebenden Zellen mittels Konfokalmikroskop genutzt werden kann. AO ist ein lipophiles Amin, das in die Zelle diffundiert und dort im sauren Lysosom akkumuliert und protoniert wird, wodurch es sein Emissionsspektrum in längere (z.B. rote) Wellenlängen ändert. Durch blaues Licht angeregt sorgt der Farbstoff für eine Photooxidation der lysosomalen Membran (Brunk *et al.*, 1997), wodurch der lysosomale pH-Gradient sinkt und AO ins Zytosol diffundiert. Dort wird das rote in ein grünes Emissionsspektrum umgewandelt. Die lysosomale Permeabilitätszunahme kann folglich entweder durch eine Abnahme der roten oder als Zunahme der grünen Fluoreszenz beobachtet werden (Kirkegaard *et al.*, 2010; Petersen *et al.*, 2013).

Um Lysosomen mithilfe von Acridin-Orange zu untersuchen, wurden CTLL-2 Zellen verwendet, welche sich durch besonders große Lysosomen auszeichnen. Die CTLL-2 Zellen stammen von einem Klon zytotoxischer T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen ab. Die Kultivierung erfolgte in ATCC RPMI-1640 Medium (ATCC® 30-2001™). Dieses wurde durch 2mM L-Glutamin, 1mM Natrium Pyruvat, 10% fetales Kälberserum und 10% T-STIM mit Con A ergänzt. Das Wachstum der CTLL-2 Zellen ist IL-2-abhängig, daher wurde dem Medium IL-2 zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

Für das Experiment wurden 10<sup>6</sup> Zellen in einem Dunkelreaktionsgefäß mit 20µM Desipramin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Färbung erfolgte daraufhin entweder unmittelbar nach Zugabe von Desipramin oder ein bzw. zwei Stunden nach Inhibitorzugabe. Zur Färbung wurden die Zellen für 20 Minuten mit 6,6µM Acridin-Orange bei 37°C inkubiert, bevor zweimal mit warmem PBS gewaschen wurde. 250.000 gefärbte und gewaschene CTLL-2 Zellen wurden auf Objektträger für die Konfokalmikroskopie überführt. Alle Schritte wurden möglichst im Dunkeln ausgeführt, da der Farbstoff durch blaues Licht, wie es auch im Tageslicht vorkommt, angeregt wird und die Photooxidation der lysosomalen Membran schon aktiviert würde.

Die Fokussierung der Zellen und der Lysosomen, erkennbar als dunkle Spots innerhalb der Zelle, erfolgte möglichst schnell im Hellfeld. Mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von einem Frame pro 20sec für eine Gesamtdauer von 4 Minuten, einer Laser-Wellenlänge von 489nm und Recordingfiltern von 503nm bis 690nm wurden die Daten erhoben. Alle Messungen fanden innerhalb der ersten Stunde nach Färbung statt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Zeiss Software ZEN. Es wurden zu jedem Zeitpunkt zehn bis 15 lysosomale Kompartimente evaluiert.

### **4.3 Proteinanalyse**

Zur Untersuchung von Proteinen (z.B. Cathepsine) in murinen CD4+ Zellen nach Asm-Inhibition wurden SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGE) und Western Blots durchgeführt. Mit der SDS-PAGE werden sämtliche Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, um mit dem Western Blot die einzelnen Proteinfractionen zu analysieren.

#### 4.3.1 SDS-PAGE und Western Blot

Nach der Isolation von CD4<sup>+</sup> Zellen (siehe 4.1.4) wurden 10<sup>7</sup> bis 10<sup>8</sup> Zellen in An- und Abwesenheit von Desipramin (0; 5µM) und IL-2 (0; 0,1µM Proleukin), wie in 4.1.5 beschrieben, inkubiert.

Um ein Zelllysat der gesamten Zelle zu erhalten, wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit RIPA-Lysepuffer (0,5ml RIPA, 0,5µl DTT, 5µl Phosphataseinhibitor) für eine Stunde bei 4°C lysiert. Nach Zentrifugation bei 4800g für 5 min wurde der proteinhaltige Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und der Zellschrott verworfen.

Zur Untersuchung von apoptotisch wirksamen Proteinen wurde die zytosolische Proteinfraction benötigt. Dazu wurde die Zellyse mittels Minute™ Plasma Membrane Protein Isolation Kit der Firma MoBi Tec nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Proteinquantifizierung der Lysate erfolgte nach der BCA-Methode mit Kupfersulfat am Photometer. Die benötigte Lysatmenge (40-120µg) für den Western Blot wurde mit loading dye versetzt und für 5min bei 95°C im Wasserbad aufgeköcht, um Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufzubrechen.

Für die SDS-PAGE wurden 10%- bzw. 12%ige Trenngele gegossen. Nach deren Aushärtung wurde das Sammelgel eingefüllt, worin ein Kamm eingeschoben wurde. Nach Polymerisation der Gele wurde die Kammer in Proteingelpuffer gestellt und mit frischem Puffer befüllt, der Kamm entfernt und in die entstandenen Taschen gleiche Proteinmengen der zu analysierenden Proben geladen. Nach fünf bis sechs Stunden Laufzeit bei einer Spannung von 80-100V wurde die vollständige Trennung der Proteine erreicht.

Mittels Semi-dry-Blot wurden die in der SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine Nitrocellulose Membran transferiert. Dazu wurden zunächst jeweils zwei Whatman-Papers in 300mM und 30mM Anodenpuffer getränkt und auf der Anode der Transfereinheit aufeinandergeschichtet, anschließend die in 30mM Anodenpuffer getränkte Nitrocellulose Membran und das in Kathodenpuffer getränkte Gel darauf geschichtet. Abschließend wurde das Gel mit einem in Kathodenpuffer getränkten Whatmanpaper abgedeckt und die Transfereinheit geschlossen. Der Transfer erfolgte durch Anschluss an eine Stromquelle bei 125mA für 75min.

### **4.3.2 Immunoblot**

Um unspezifische Bindestellen zu blocken, wurde die Membran mit 5%iger fettfreier Trockenmilch in PBS-T für 20min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde die Membran mit dem Antikörper des zu analysierenden Proteins (z.B. rabbit anti-Cathepsin B und rabbit anti-Cathepsin D, jeweils 1:1.000 in 5% Milch) beladen und über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde Meerrettichperoxidase-Immunkonjugat (HRP-linked antibodies) eingesetzt. Die Peroxidase setzt bei Hinzugabe von HRP-Aktivatoren das Substrat Luminol um, wodurch Photonen frei werden, die an der Stelle zur Detektion der spezifisch markierten Proteinbanden führen.

Die Analyse von „house keeping“ Genen (z.B. GAPDH) diente dazu, Unterschiede in den Bandenstärken durch unregelmäßig beladene Proteinmengen auszuschließen. Dazu wurde die Membran mit rabbit anti-GAPDH 1:10.000 in 5% Milch über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschrritten wurde ein Sekundärantikörper (Anti-rabbit Alexa 647 1:10.000 in 5% Milch) aufgetragen und bei Raumtemperatur für eine Stunde auf der Wippe inkubiert.

Mittels des LI-COR Odyssey® Fc wurden Bildaufnahmen der proteinbeladenen Nitrocellulose-Membranen angefertigt.

### **4.4 FACS-Analyse**

Zur Ermittlung der T-Zell-Frequenzen wurde die Durchflusszytometrie am LSR II durchgeführt. Dazu wurden die zu analysierenden Zellen in eine 96-V-Bodenplatte überführt und bei 190g zentrifugiert. Unspezifische Bindestellen wurden mit 25µl Blockingpuffer gesättigt, bestehend aus anti-Fcγ Rezeptor II/III monoklonalem Antikörper (Klon 2.4.G2) und FACS-Puffer (1:10). Nach 15-minütiger Inkubation bei 4°C wurden 25µl einer Lösung aus extrazellulären Antikörpern, in doppelter Konzentration verdünnt mit FACS-Puffer hinzugefügt. Als Antikörper für die Zelloberflächenfärbung wurden anti-CD4 Brillant Violett 421 in der Endkonzentration 1:750, anti-CD25-PE (Endkonzentration 1:100) und vd780 APC-Cy7 in der Endkonzentration 1:1000 eingesetzt und für weitere 15min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit PBS gewaschen. Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen mit Fixperm-Lösung 1:4 für 30min bei Raumtemperatur fixiert und mit Permpuffer (10X-Permpuffer 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt) gewaschen. Dann wurden die Antikörper anti-Foxp3 PerCP-Cy5.5 (1:300) und anti-CTLA4-PE-Cy7 (1:250) mit Permpuffer verdünnt hinzugegeben und für 45min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen mit Permpuffer wurden die Zellen in 50µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen



überführt. Um absolute Zellzahlen bestimmen zu können, wurden pro Ansatz zusätzlich 10.000 Beads hinzugefügt.

Die vom LSR II gemessene Zellanzahl wurde dann entsprechend der gezählten Beads anhand folgender Formel genormt:

$$\frac{10.000 \times \text{gemessene Zellzahl}}{\text{Anzahl gemessener Beads}}$$

## 5 Ergebnisteil

### 5.1 Verhalten der T-Zellpopulationen nach Inhibition der sauren Sphingomyelinase

#### 5.1.1 Vergleichende Analyse von T-Zell Populationen nach *in vitro* Behandlung mit Antidepressiva

Desipramin zählt neben seiner Wirkung als trizyklisches Antidepressivum zu den Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase (Asm). Die Asm-inhibitorische Aktivität von Desipramin wurde bereits in humanen Fibroblasten (Albouz *et al.*, 1981), Krebszelllinien (Arimochi and Morita, 2008) und verschiedenen Lymphozyten (zusammengefasst in Beckmann *et al.*, 2014) untersucht. Sertralin hingegen zählt zur Gruppe der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI). Auch für Sertralin wurde eine funktionell-inhibitorische Wirkung auf die saure Sphingomyelinase bestätigt (Kornhuber *et al.*, 2008).

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass die Inhibition der Asm auch Auswirkungen auf CD4+ T-Zell Populationen hat. So steigt die Frequenz von Treg-Zellen innerhalb der CD4+ T-Zellen in Asm-defizienten Mäusen an (Hollmann *et al.*, 2016). In der vorliegenden Arbeit sollen die dabei zugrundeliegenden Mechanismen in einem *in vitro* System tiefergehend analysiert werden. Dafür wurden zunächst Versuche mit pharmakologischer Asm-Inhibition wiederholt. Wildtypische Milzzellen wurden dazu gemeinsam mit unterschiedlichen Konzentrationen des Asm-Inhibitors Desipramin oder Sertralin für drei Tage kultiviert und T-Zell Populationen mittels Durchflusszytometrie quantitativ analysiert.

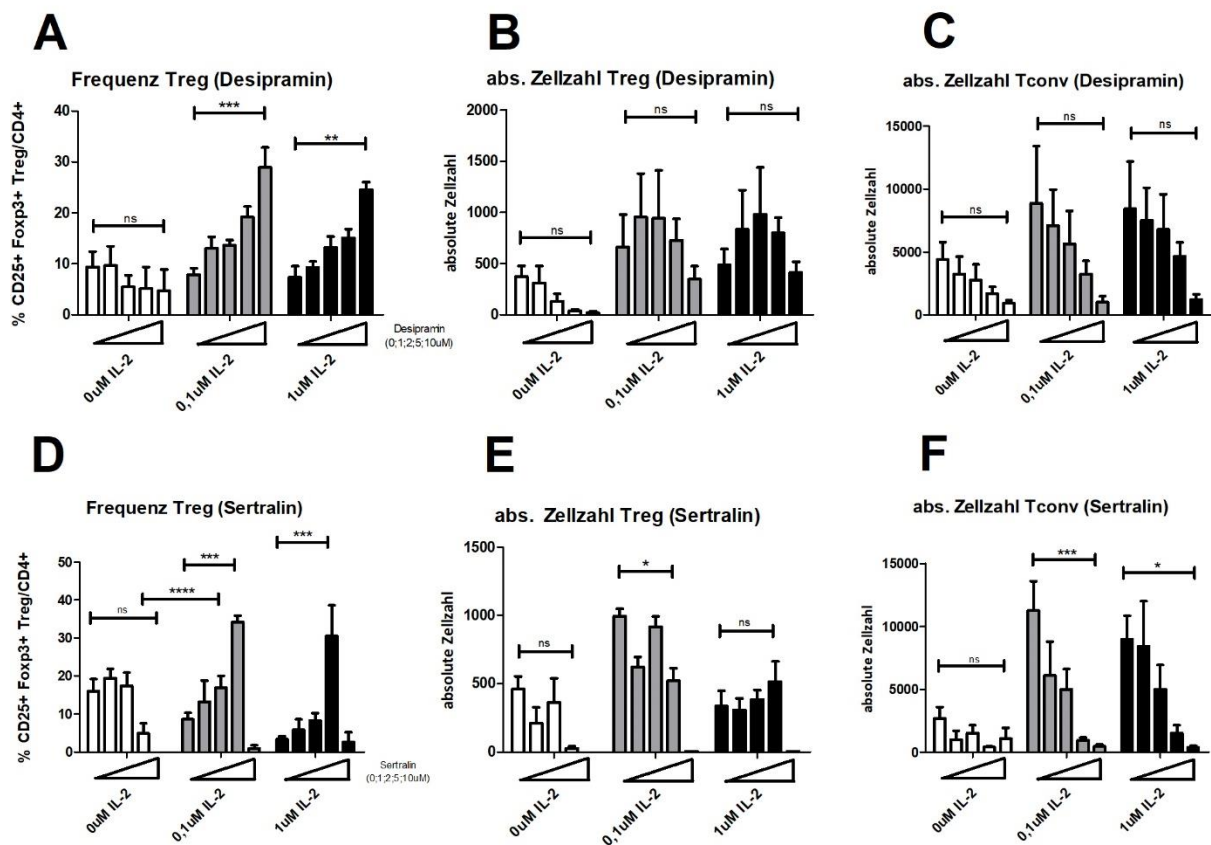


Abbildung 5: Anstieg der Treg-Frequenz nach *in vitro* Behandlung von Lymphozyten mit den Asm-Inhibitor Desipramin und Sertralin (jeweils 0; 1; 2; 5 und 10 μM)

Wildtypische Milzzellen ( $2 \times 10^5$  Zellen pro Well, 96 Well Rundbodenplatte) wurden in An- und Abwesenheit von IL-2 für drei Tage kultiviert und der Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen Desipramin (A-C) und Sertralin (D-F) auf die CD4<sup>+</sup> Zellen untersucht. Analysiert wurde die Treg-Frequenz (A, D) sowie die absolute Zellzahl von Tregs (B, E) und Tconv (C, F). Die Desipramin-Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen aus  $n=5$  Tieren pro Gruppe, die Sertralin-Daten aus  $n=3$  Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels 2way ANOVA mit Tukey post-hoc multiple comparisons test (ns = keine Signifikanz, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). Verglichen werden die einzelnen Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen.

Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, steigt die Frequenz der regulatorischen T-Zellen im Verhältnis zu den konventionellen T-Zellen mit steigender Konzentration von Desipramin und Sertralin unter dem Einfluss von IL-2 signifikant an. Dieser Frequenzanstieg resultiert daraus, dass die absolute Zellzahl der Tconv-Zellen sinkt (Abbildung 5C und F), während sie von Treg-Zellen (Abbildung 5B und E) gleichbleibt. Von einer toxischen Wirkung der Asm-Inhibitoren Desipramin und Sertralin kann ausgegangen werden: ab

einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Desipramin sterben sowohl konventionelle als auch regulatorische T-Zellen. Die toxische Wirkung von Sertralin tritt dagegen schon ab 5 $\mu\text{M}$  ein (vgl. Abbildung 5C-E). Die maximale Treg-Frequenz wird mit 5 $\mu\text{M}$  Sertralin (Abbildung 5D) und mit 10 $\mu\text{M}$  Desipramin erreicht (vgl. Abbildung 5A). Der Anteil der Treg-Zellen innerhalb der CD4+ Zellen, der maximal erreicht werden kann, ist hierbei zwischen Sertralin und Desipramin vergleichbar. Während bei 5 $\mu\text{M}$  Sertralin ein Anteil regulatorischer T-Zellen innerhalb der CD4+ Zellen von etwa 33% erreicht wird (Abbildung 5D), liegt dieser Anteil bei der Desipramin-Behandlung bei 29% (vgl. Abbildung 5A).

Die Versuche zeigen außerdem, dass der Frequenzanstieg der Treg-Zellen nach Asm-Inhibition sowohl durch Desipramin als auch durch Sertralin nur in Gegenwart von IL-2 auftritt. In Abwesenheit von Proleukin dagegen ist ein Sterben sowohl von Tconv als auch Treg zu verzeichnen. Die Zahl der lebenden Tconv und Treg ist in Anwesenheit von IL-2 signifikant höher als in Abwesenheit von IL-2.

### **5.1.2 Bisphosphonat ARC39 ohne Auswirkung auf T-Zell-Frequenzen**

Das Bisphosphonatmonomer ARC39 gilt als einer der spezifischsten und effizientesten Asm-Inhibitoren, da er im Gegensatz zu den TZAs und SSRIs direkt am katalytischen Zentrum der Asm wirkt (Roth *et al.*, 2009). Analog zur Untersuchung von T-Zellpopulationen nach *in vitro* Behandlung mit Sertralin oder Desipramin wurde auch der Einfluss von ARC39 auf das Verhältnis zwischen wildtypischen Treg- und Tconv-Zellen getestet.

Die Ergebnisse zeigen, dass ARC39 im Gegensatz zu den beiden eingesetzten Antidepressiva nicht zu einer Erhöhung der Treg-Frequenzen führt. Unter dem Einfluss von IL-2 steigt nach Einsatz von ARC39 die Treg-Frequenz nicht an, sondern nimmt, wenn auch nicht signifikant, ab (vgl. Abbildung 6). Wie in den Abbildung 6B und Abbildung 6C zu sehen, sind die absoluten Zellzahlen sowohl von Treg als auch von Tconv nach Behandlung mit ARC39 keiner signifikanten Änderung ausgesetzt. Sie fallen bei der Behandlung mit 5 $\mu\text{M}$  ARC39 sehr gering aus, da hier auf eine Toxizität von ARC39 geschlossen werden kann. Bei 5 $\mu\text{M}$  ARC39 sterben Treg- und Tconv-Zellen sowohl mit als auch ohne IL-2 (siehe Abbildung 6B und C). Die in den Vorversuchen mit Desipramin und Sertralin beobachtete protektorische Wirkung von IL-2 auf regulatorische T-Zellen kann bei der Behandlung mit ARC39 also nicht bestätigt werden. (siehe Abbildung 6B sowie Abbildung 5B und E).

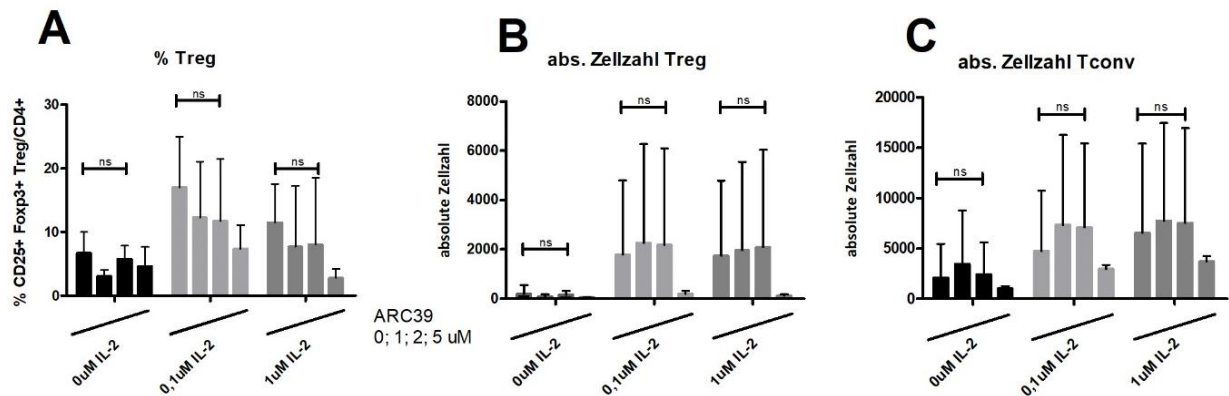


Abbildung 6: Fehlende Frequenzsteigerung von Treg-Zellen nach *in vitro* Behandlung mit dem Asm-Inhibitor ARC39 (jeweils 0; 1; 2 und 5  $\mu$ M)

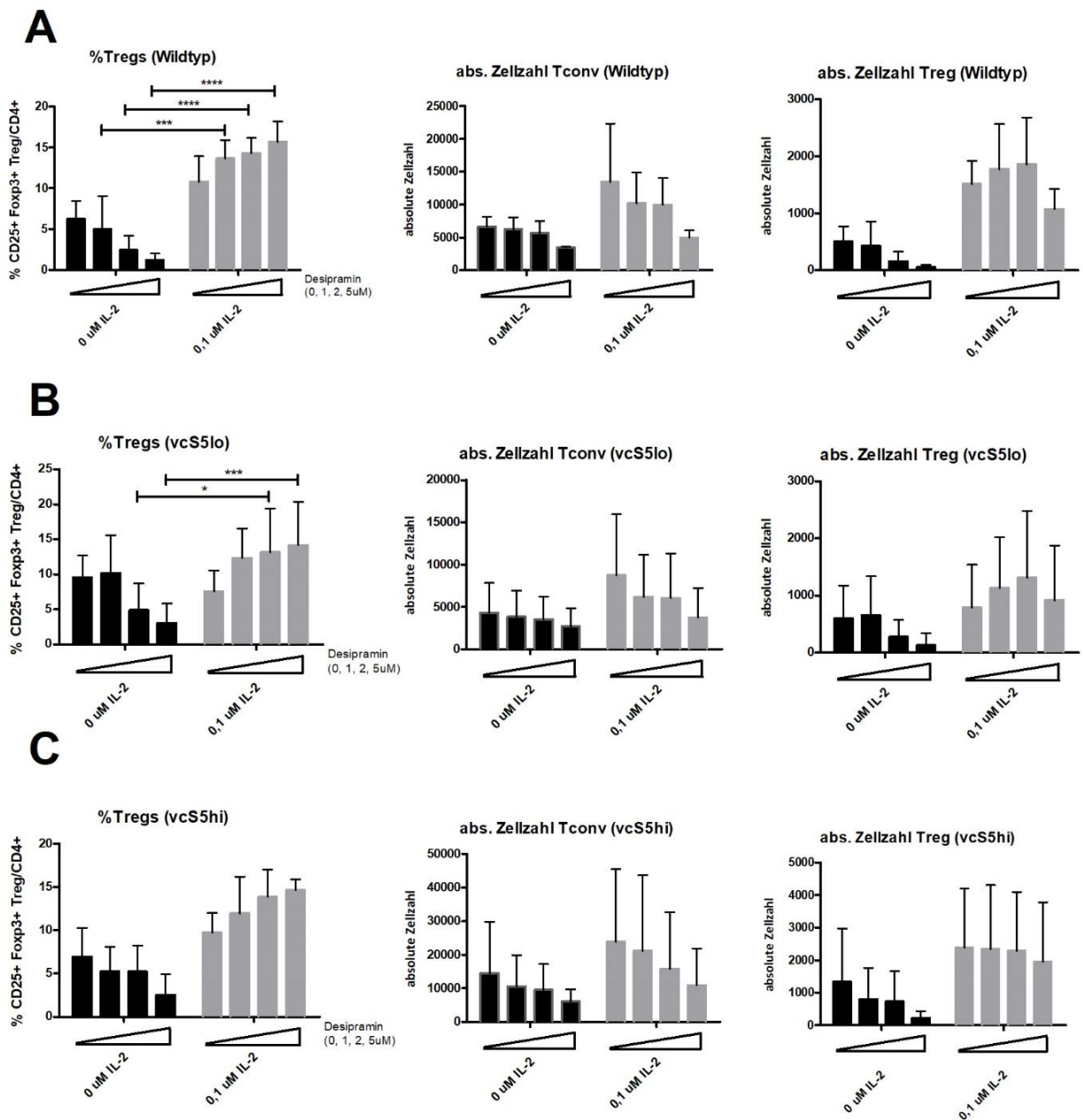
Wildtypische Milzzellen ( $2 \times 10^5$  Zellen pro Well, 96 Well Rundbodenplatte) wurden in An- und Abwesenheit von IL-2 für drei Tage kultiviert und der Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen ARC39 auf die CD4<sup>+</sup> Zellen untersucht. Analysiert wurden die Frequenzen von Treg (A) sowie die absolute Zellzahl von Treg (B) und Tconv (C). Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen aus  $n=4$  Tieren pro Gruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mittels 2way ANOVA mit Tukey post-hoc multiple comparisons test ( $ns$  = keine Signifikanz,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ). Verglichen werden die einzelnen Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen.

## 5.2 IL-2 schützt regulatorische T-Zellen vor dem Zelltod

Die Ergebnisse der Vorversuche belegen, dass IL-2 nach Behandlung der Zellen mit Desipramin oder Sertralin für das Überleben der CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen verantwortlich ist. Um den Einflussfaktor genauer zu differenzieren, soll untersucht werden, an welcher Stelle der IL-2 Signalkaskade das Überlebenssignal ausgelöst wird. Die Bindung an den IL-2-Rezeptor führt zur Expression von STAT5, was wiederum die antiapoptotisch wirksamen Proteine der Bcl-Familie aktiviert. Dadurch werden die proapoptotisch wirksamen Cathepsine 3 und 7 sowie BAX/BAK gehemmt (vgl. Abbildung 4). Unter Verwendung von Lymphknoten transgener STAT5-Mauslinien, bei denen konstitutiv aktives STAT5 mäßig (vcS5lo) und massiv (vcS5hi) hochexprimiert vorliegen (Maurer *et al.*, 2020), erfolgte die Behandlung nach Standardprotokoll des Desipramin-/IL-2-Versuchs.

Parallel zu den Effekten von Desipramin auf wildtypische Zellen ist Abbildung 7 zu entnehmen, dass in Abwesenheit von IL-2 sowohl die Anzahl regulatorischer und konventioneller T-Zellen als auch die Frequenz regulatorischer T-Zellen im Vergleich zur Anwesenheit von IL-2 insgesamt in allen Mauslinien geringer ausfällt. Mit steigender Desipraminkonzentration sind eine Abnahme der Treg-Frequenz und eine Abnahme der

absoluten Anzahl von Tconv und Tregs in Abwesenheit von IL-2 zu verzeichnen. In Anwesenheit von IL-2 wiederum kann mit zunehmender Konzentration von Desipramin eine Frequenzsteigerung regulatorischer T-Zellen infolge eines Sterbens konventioneller T-Zellen beobachtet werden. Dieses Verhalten zeigt sich nicht nur bei den wildtypischen Lymphozyten. Die beschriebenen Effekte des Desipramin treten auch in den untersuchten Lymphknotenzellen der transgenen STAT5-Mauslinien (vcS5lo und vcS5hi) auf. Daher ist ein relativer Mangel an STAT5 in wildtypischen Tconv gegenüber Treg nicht für die unterschiedliche Wirkung von Desipramin in An- und Abwesenheit von IL-2 verantwortlich.



#### Abbildung 7: STAT5 schützt T-Zellen nicht vor dem Zelltod

Wildtypische Lymphknotenzellen (A) sowie Lymphknotenzellen transgener STAT5-Mauslinien ( $2 \times 10^6$  Zellen pro Well, 96 Well Rundbodenplatte) wurden in An- und Abwesenheit von IL-2 für drei Tage kultiviert und der Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen des Asm-Inhibitors Desipramin (jeweils 0; 1; 2 und 5  $\mu\text{M}$ ) auf T-Zellen untersucht. Die Linie vcS5lo (A) enthält nur eine Kopie des Transgens, vcS5hi (C) enthält mehrere Transgene. Analysiert wurden die Frequenzen von Treg sowie die absoluten Zellzahlen von Tconv- und Treg-Zellen. Der Vergleich wildtypischer und transgener Lymphozyten zeigt nach Inhibitorbehandlung keine Frequenzunterschiede. Mit zunehmender Desipraminkonzentration nimmt die absolute Zahl konventioneller T-Zellen ab, während die Frequenz regulatorischer T-Zellen bei gleichbleibender Treg-Zahl ansteigt. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen aus  $n=4$  Tieren pro Gruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mittels 2way ANOVA mit Tukey post-hoc multiple comparisons test ( $ns$  = keine Signifikanz,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ). Verglichen werden die einzelnen Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen.

### 5.3 Zelltod konventioneller T-Zellen durch proapoptotisch wirksame Proteine

#### 5.3.1 Caspasen als möglicher Faktor für Asm-induzierten Zelltod

Z-VAD-FMK (kurz: ZVAD) ist ein synthetisch hergestellter zellmembranpermeabler Pan-Caspase-Inhibitor. Er verhindert vor allem die Prozessierung von Caspase-3, also jenes Enzyms, das die Verbindung des intrinsischen und extrinsischen Wegs und die Endstrecke der Apoptose darstellt (Slee *et al.*, 1996).

Um zu überprüfen, ob der Zelluntergang der konventionellen T-Zellen nach Asm-Inhibitor-Behandlung auf der Freisetzung von proapoptotischen Proteinen und weiter nachgeschaltet auf einem Caspase-abhängigen Signaltransduktionsweg beruht, wurde den mit Desipramin-behandelten Zellen zeitgleich der Pan-Caspase-Inhibitor ZVAD hinzugefügt. Beruht der Untergang konventioneller T-Zellen nach Asm-Inhibitor-Behandlung auf apoptotischen Vorgängen, so ist zu erwarten, dass der Caspase-Inhibitor das Sterben von Tconv verhindert. Um eine Protektion regulatorischer T-Zellen zu erreichen wurde zusätzlich IL-2 zugegeben.

Im Kontrollansatz ohne ZVAD ist ein Anstieg der Frequenz regulatorischer T-Zellen mit ansteigender Desipramin-Konzentration festzustellen, was mit den Ergebnissen der Ausgangsversuche (siehe 5.1.1) kongruent ist. Abbildung 8A ist zu entnehmen, dass der Caspase-Inhibitor vor allem bei einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  den relativen Anstieg der Treg-Frequenzen in Gegenwart von Desipramin und IL-2 hemmt. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass das Sterben konventioneller T-Zellen bis zur Konzentration von 1  $\mu\text{M}$

Desipramin verhindert wird (vgl. Abbildung 8C). Bei höheren Desipramin-Konzentrationen ist weiterhin der Zelltod zu beobachten. Schließlich kann lediglich ein tendenzieller Schutz konventioneller T-Zellen mittels Caspase-Inhibitors festgestellt werden. Eine Protektion der Tconv-Zellen kann nur bei hohen Konzentrationen des Caspase-Inhibitors bei gleichzeitig geringer Asm-Inhibitor-Konzentration erzielt werden. Demnach erzielt ZVAD keine eindeutige Inhibition der Apoptose, sodass weitere Mechanismen in Erwägung gezogen werden müssen. Die absolute Zellzahl regulatorischer T-Zellen ist bei Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor tendenziell, jedoch nicht signifikant höher (siehe Abbildung 8B).

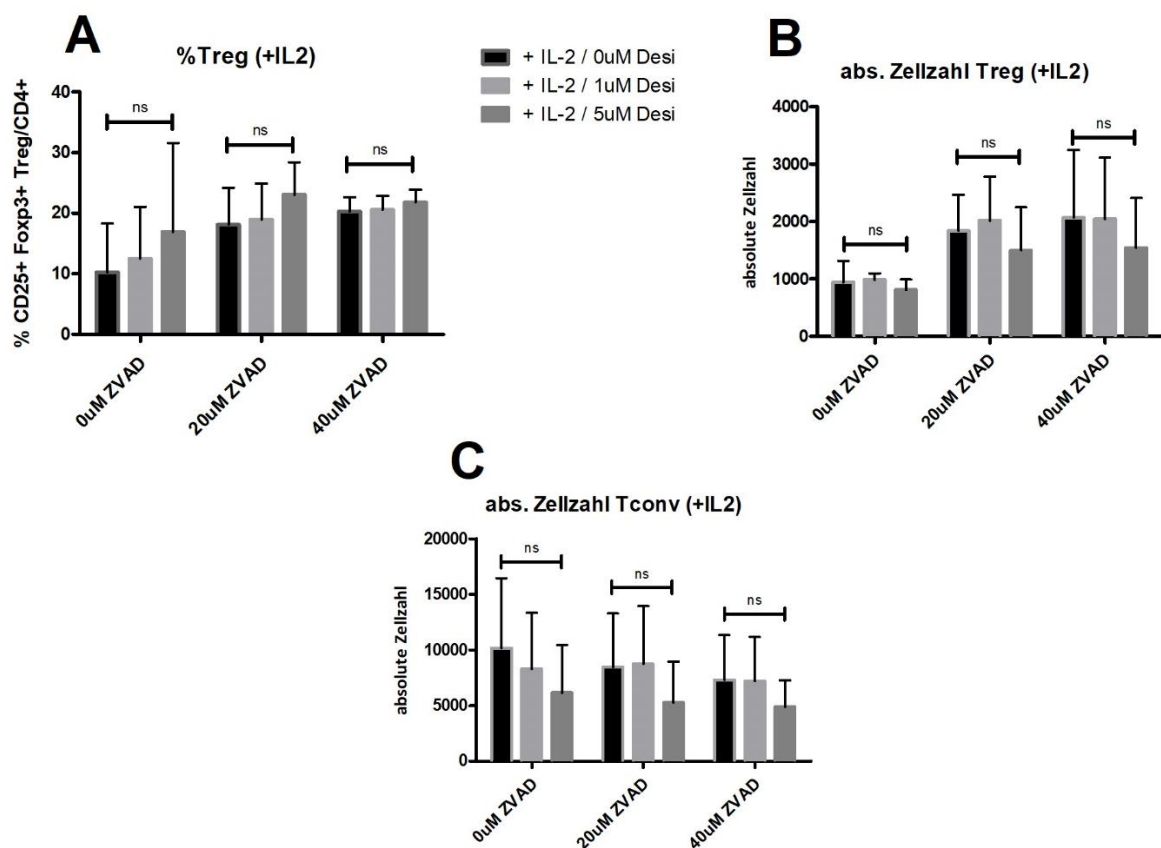


Abbildung 8: Inkubation muriner Lymphozyten mit dem Pan-Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK Wildtypische Milzzellen ( $2 \times 10^5$  Zellen pro Well, 96 Well Rundbodenplatte) wurden in Anwesenheit von IL-2 für drei Tage kultiviert und der Einfluss des Caspase-Inhibitors ZVAD auf Desipramin-behandelte T-Zellen untersucht. Analysiert wurden die Frequenzen von Treg (A) sowie die absoluten Zellzahlen von Treg (B) und Tconv (C). Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen aus  $n=3$  Tieren pro Gruppe. Bei geringen Desipraminkonzentrationen kann der Caspaseinhibitor ein Sterben konventioneller T-Zellen verhindern, wodurch eine Frequenzerhöhung regulatorischer T-Zellen ausbleibt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels 2way ANOVA mit Tukey post-hoc multiple comparisons test (ns = keine Signifikanz,  $*p <$



0,05, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). Verglichen werden die einzelnen Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen.

### 5.3.2 HIF-1 $\alpha$ nimmt als zusätzlicher Stressfaktor Einfluss auf das Schicksal der T-Zelle

In Experimenten mit dem Asm-Inhibitor Fluphenazin konnte gezeigt werden, dass Hypoxie als weiterer Einflussfaktor die Apoptose begünstigt (Klutzny *et al.*, 2017). Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 $\alpha$  exprimiert, das neben der Akkumulation von Sphingomyelin durch den Asm-Inhibitor einen weiteren Stressfaktor darstellen kann, jedoch sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Signale erzeugen kann (Klutzny *et al.*, 2017). Der Einfluss weiterer Stressfaktoren bestimmt über das Gleichgewicht pro- und antiapoptotischer Signale und letztlich über das Schicksal der Zelle (Klutzny *et al.*, 2017).

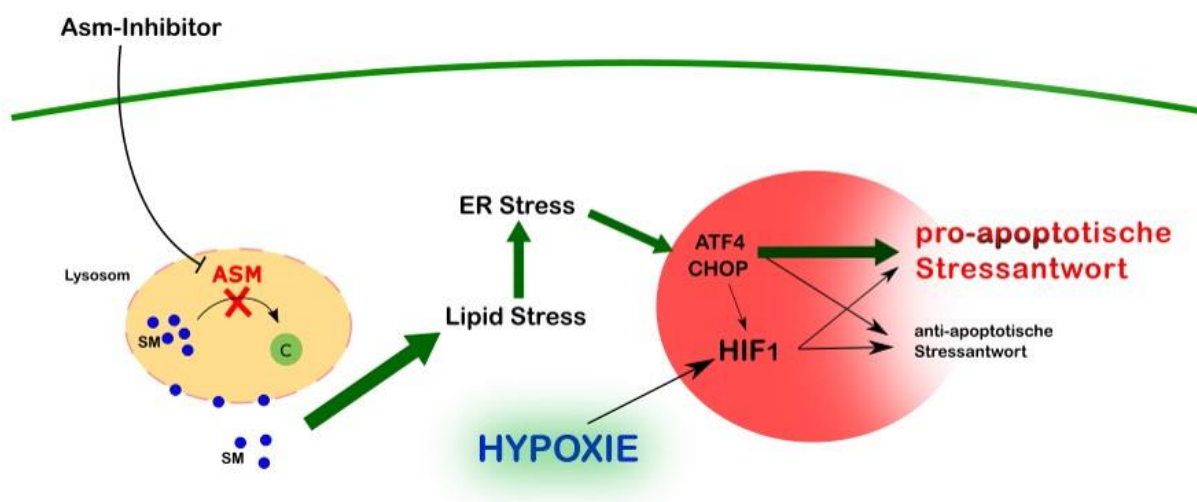


Abbildung 9: Hypoxie beeinflusst die Stressantwort auf erhöhte Sphingomyelinakkumulation. Asm-Inhibitoren hemmen den Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid, wodurch es zur Akkumulation von Sphingomyelin im Lysosom und schließlich zu Lipidstress in der Zelle kommt. Die erhöhte Stoffwechselaktivität am Endoplasmatischen Retikulum führt zur Expression von ATF4 und CHOP. Zusätzlicher Stress durch Hypoxie führt zur Expression von HIF-1 $\alpha$ . ATF4 und CHOP sowie HIF-1 $\alpha$  können sowohl proapoptotisch als auch antiapoptotisch wirken. Entscheidend ist die Wechselwirkung und Balance zwischen den Transkriptionsfaktoren. Überschreitet der zytoplasmatische Gehalt an Sphingomyelin eine Grenze, überwiegt der proapoptotische Stimulus. SM = Sphingomyelin; C = Ceramid; ASM = Saure Sphingomyelinase. Angelehnt an Klutzny *et al.*, 2017.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Asm-Inhibition und IL-2 einen Einfluss auf das Überleben und Sterben von CD4<sup>+</sup> T-Zellen hat, soll nun die Rolle von HIF-1 $\alpha$  auf das selektive Überleben CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber konventionellen CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> T-Zellen nach Asm-Inhibition untersucht werden. Unter Verwendung von Lymphozyten aus CD4Cre HIF-1 $\alpha$  flox/flox Mäusen, in denen die T-Zellen defizient für HIF-1 $\alpha$  sind, und von Lymphknotenzellen wildtypischer B6-Kontrolltiere erfolgte die Behandlung mit Desipramin und IL-2. Anschließend wurden sie durchflusszytometrisch quantifiziert. Das Experiment wurde bei Normoxie und entsprechend geringer Expression von HIF-1 $\alpha$  durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte standardmäßig bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

In Abwesenheit von HIF-1 $\alpha$  ist ein Anstieg der Frequenz regulatorischer T-Zellen mit steigender Asm-Inhibitorkonzentration zu beobachten (Abbildung 10A), vergleichbar zu den wildtypischen Lymphozyten (nicht gezeigte Daten). Diese Frequenzverschiebung beruht wiederum auf dem Sterben konventioneller T-Zellen (Abbildung 10C). Die Abwesenheit von HIF-1 $\alpha$  hat hierbei weder Einfluss auf ein erhöhtes Absterben konventioneller T-Zellen, noch begünstigt sie ein Überleben von Treg-Zellen. Außerdem erkennt man in Abwesenheit von HIF-1 $\alpha$ , dass mehr Treg-Zellen in Anwesenheit als in Abwesenheit von IL-2 überleben (Abbildung 10B). Insgesamt sind die Ergebnisse also äquivalent zu den Versuchen mit wildtypischen Mäusen. Der Knockout von HIF-1 $\alpha$  sorgt unter dem Einfluss von Desipramin für keinerlei Veränderungen in der T-Zell-Verteilung.

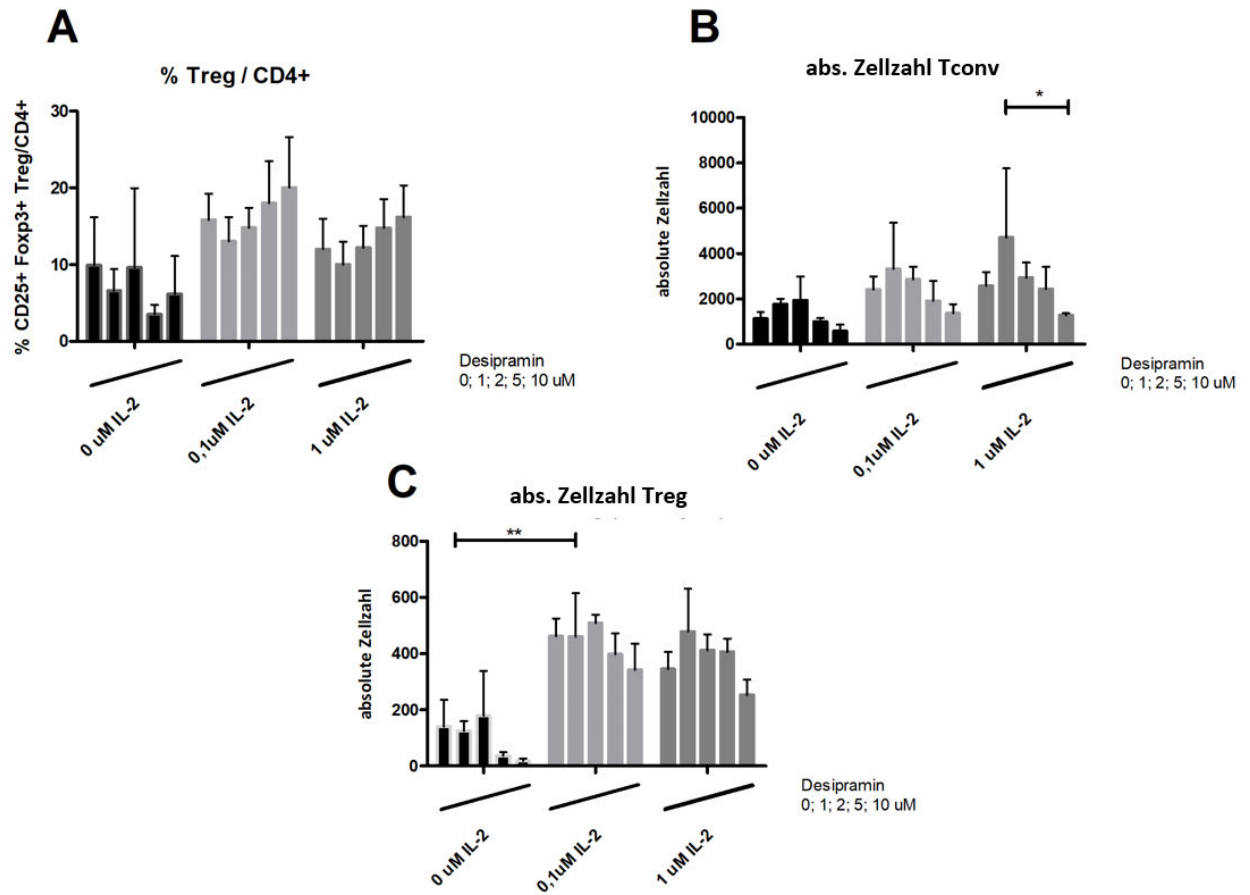


Abbildung 10: Inkubation von Lymphozyten aus CD4Cre HIF-1 $\alpha$  flox/flox Mäusen mit Desipramin und IL-2

Milzzellen aus CD4Cre HIF-1 $\alpha$  flox/flox Mäusen ( $2 \times 10^5$  Zellen pro Well, 96 Well Rundbodenplatte) wurden in An- und Abwesenheit von IL-2 für drei Tage kultiviert und der Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen Desipramin auf die CD4 $^+$  Zellen untersucht. Analysiert wurde die Treg-Frequenz (A) sowie die absolute Zellzahl von Tconv (B) und Tregs (C). Die Behandlung der Zellen mit Desipramin zeigt eine Frequenzerhöhung von Treg-Zellen durch Zelltod von Tconv-Zellen. Unter IL-2 überleben mehr Zellen als ohne den Einfluss von IL-2. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen aus  $n=3$  Tieren pro Gruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mittels 2way ANOVA mit Tukey post-hoc multiple comparisons test ( $ns$  = keine Signifikanz,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ). Verglichen werden die einzelnen Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen.

Ein weiteres Experiment sollte zeigen, ob eine Erhöhung der HIF-1 $\alpha$  Konzentration Effekte auf das Überleben der T-Zellen hat. Der dazu eingesetzte Inhibitor der Prolyl- und Asparaginyhydroxylase Dimethyloxaloylglycin (DMOG) führt zu einem verringerten Abbau und damit zur erhöhten Konzentration von HIF-1 $\alpha$  (Herstellerangaben). Man erkennt nicht signifikant, jedoch tendenziell, dass die Anzahl konventioneller T-Zellen

unter dem Einfluss von DMOG mit zunehmender Desipramin-Konzentration weniger stark abnimmt als in den Kontrollansätzen (Abbildung 11C). Dabei fällt jedoch auf, dass die Zahl der Tconv unter DMOG generell geringer ist, wodurch die Frequenz der Treg-Zellen unter dem Einfluss von DMOG signifikant höher ist als in Abwesenheit von DMOG (Abbildung 11A). Eine Änderung im Frequenzanstieg lässt sich in Anwesenheit von DMOG im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne DMOG nicht ablesen (Abbildung 11A).

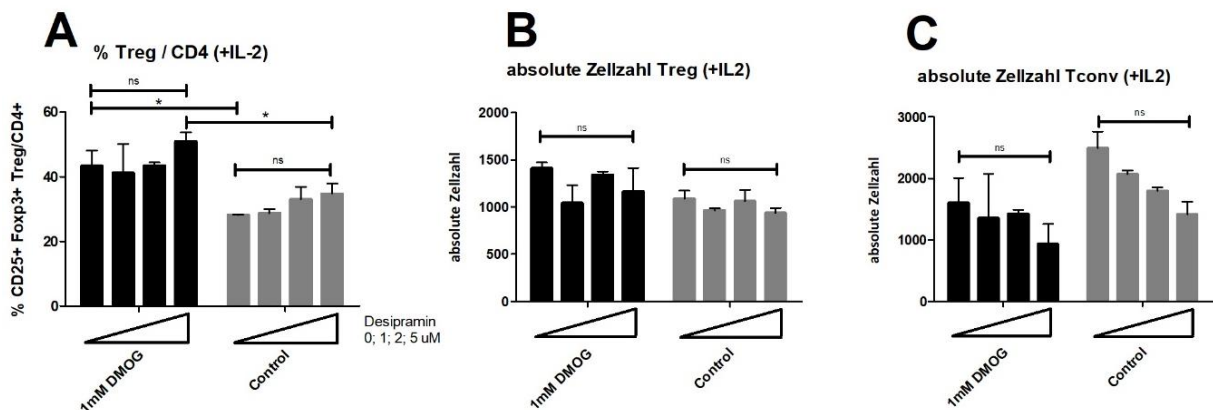


Abbildung 11: Inkubation von murinen Lymphozyten mit DMOG und Desipramin

Wildtypische Milzzellen ( $2 \times 10^5$  Zellen pro Well, 96 Well Rundbodenplatte) wurden in Anwesenheit von IL-2 mit unterschiedlichen Konzentrationen Desipramin für drei Tage kultiviert und der Einfluss von Dimethylloxaloylglycin (DMOG) auf die CD4+ Zellen untersucht. Analysiert wurde die Treg-Frequenz (A) sowie die absolute Zellzahl von Tregs (B) und Tconv (C). Die Sterberate der Tconv-Zellen nach Desipraminbehandlung ist unter DMOG geringer als im Kontrollansatz ohne DMOG. Die Treg-Zellfrequenz ist unter DMOG signifikant höher. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen aus  $n=2$  mit je Triplikaten pro Gruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mittels 2way ANOVA mit Tukey post-hoc multiple comparisons test (ns = keine Signifikanz,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ). Verglichen werden die einzelnen Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen.

### 5.3.3 Asm-induzierter Zelltod durch Cathepsine

Einen wesentlichen Anteil an der Induktion von Apoptose hat die Gruppe der Cathepsine. Besonders die vom Lysosom freigesetzten Cathepsine der Klassen B und D dienen als Ausgangspunkt zur Cathepsin-Caspase-induzierten Apoptose (vgl. Abbildung 4). Um zu eruieren, ob der Zelltod konventioneller T-Zellen nach Asm-Inhibition Cathepsin-abhängig abläuft, wurden T-Lymphozyten mit Desipramin und unterschiedlichen Konzentrationen des Cathepsin-B-Inhibitors CA074 inkubiert, anschließend die absoluten und relativen Zellzahlen analysiert. Als Kontrollansatz wurden T-Zellen mit Desipramin und DMSO in zunehmender Konzentration inkubiert, da CA074 in DMSO

gelöst ist. Wenn das Sterben der Tconv Cathepsin-abhängig stattfindet, müsste CA074 zu einer Hemmung der Apoptose führen und einer Senkung der absoluten Zellzahl mit steigender Desipraminkonzentration entgegenwirken.

Während die absolute Zahl der Tconv in den Kontrollansätzen mit DMSO (Daten nicht gezeigt) ohne CA074 mit steigender Desipraminkonzentration kontinuierlich abfällt, so erkennt man in Abwesenheit von IL-2, dass die Anzahl der Tconv mit steigender CA074 Konzentration weniger abnimmt (Abbildung 12A). Ab einer Konzentration von 10 $\mu$ M CA074 sinkt die absolute Tconv-Zellzahl nicht mehr signifikant. Auffällig ist jedoch, dass der eingesetzte Cathepsininhibitor selbst eine Reduktion der absoluten Zellzahlen bewirkt (Abbildung 12A). Ohne den Einfluss von IL-2 lässt sich also ein signifikanter Schutzeffekt des Cathepsin-Inhibitors CA074 auf konventionelle T-Zellen feststellen, wobei die Toxizität des Inhibitors bei steigender Konzentration berücksichtigt werden muss.

In Anwesenheit von IL-2 und CA074 bei der Konzentration 1 $\mu$ M Desipramin erkennt man, dass die Anzahl der Tconv nicht abnimmt (Abbildung 12B). Die Wirkung des Cathepsin-B-Inhibitors bei 5 $\mu$ M ist allerdings nicht mehr ausreichend, um adäquate Überlebenssignale zu geben. Auch höhere Konzentrationen des Cathepsin-Inhibitors bewirken keine Erhöhung der Tconv-Zahl. Denkbar wäre, dass genau die Zellen, die aufgrund ihrer 3-tägigen Inkubation altersbedingt apoptotisch werden, durch den Cathepsin-Inhibitor gerettet werden und somit einen Störfaktor bei der spezifischen Betrachtung des Asm-Inhibitor-induzierten Zelltods darstellen.

Parallel zu den Ergebnissen, die beim Einsatz des Caspase-Inhibitors ZVAD erzielt wurden, kann auch hier unter IL-2 lediglich ein tendenzieller Schutz des Cathepsin-Inhibitors auf konventionelle T-Zellen festgestellt werden. Da sich hierbei keine Signifikanz zeigte, muss die Hypothese, dass die Asm-Inhibition zur Cathepsin-vermittelten Apoptose führt, in Frage gestellt werden. Alternative Erklärungsmodelle kommen in Betracht.

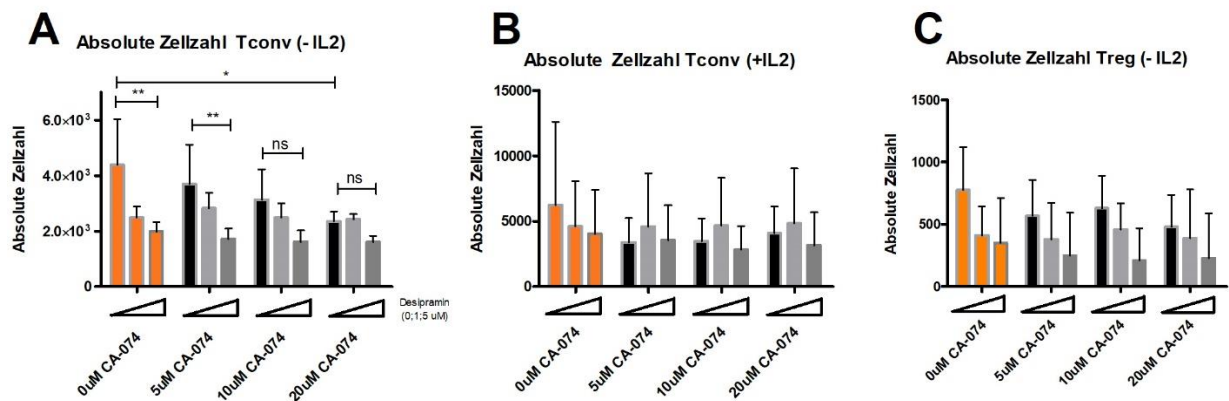


Abbildung 12: Der Cathepsin-Inhibitor CA074 reduziert das Asm-Inhibitor-assoziierte Sterben konventioneller T-Zellen nach *in vitro* Behandlung mit Desipramin.

Wildtypische Milzzellen ( $2 \times 10^5$  Zellen pro Well, 96 Well Rundbodenplatte) wurden in An- und Abwesenheit von IL-2 für drei Tage kultiviert und der Einfluss vom Cathepsin-Inhibitor CA074 auf Desipramin-behandelte T-Zellen untersucht. Die absoluten Zellzahlen von Tconv ohne IL-2 (A) sowie mit IL-2 (B) werden verglichen sowie die Zellzahl von Tregs ohne IL-2 (C) dargestellt. In Abwesenheit von IL-2 verhindert CA074 signifikant den Zelltod konventioneller T-Zellen, wobei es in zunehmender Konzentration selbst toxisch auf Tconv wirkt. In Anwesenheit von IL-2 kann CA074 auch in höherer Konzentration das Sterben von Tconv-Zellen nur bei geringen Desipraminkonzentrationen von  $1 \mu\text{M}$  verhindern. Das Sterben von Treg-Zellen durch den fehlenden Schutz von IL-2 wird durch CA074 nicht gehemmt. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen aus  $n=3$  Tieren pro Gruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mittels 2way ANOVA mit Tukey post-hoc multiple comparisons test ( $ns$  = keine Signifikanz,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ). Verglichen werden die einzelnen Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen.

Basierend auf den Ergebnissen zum Cathepsin-Inhibitor CA-074 sollte im Rahmen von Westernblots die Freisetzung von proapoptotischen Proteinen wie Cathepsin B und D qualitativ analysiert werden. Würden sie nach Behandlung von wildtypischen T-Lymphozyten mit dem Asm-Inhibitor aus den Lysosomen vermehrt ausgeschüttet, so ist anzunehmen, dass die Abnahme absoluter Zellzahlen konventioneller T-Zellen durch Apoptose zu erklären ist.

Dazu erfolgte die Auftrennung der Zellen nach Inhibitorbehandlung in ihre Bestandteile, um gezielt die zytosolische Fraktion zu betrachten, in die lysosomale Apoptose-induzierende Proteine nach Asm-Inhibitor-Behandlung freigesetzt werden. Immunoblots sollten proapoptotisch wirksame Cathepsine detektieren.

Wie sich zeigte, können Änderungen von Sphingolipid-Konzentrationen zu Veränderungen der Membranstruktur führen. So beeinflusst beispielsweise die Produktion von Ceramiden die Membranfluidität und -permeabilität (Heinrich *et al.*, 1999; zusammengefasst in Krönke, 1999). Bekannterweise führt die Hemmung der Asm mit TZA und SSRI zu einer Ablösung der Asm und der sauren Ceramidase von der inneren lysosomalen Membran und zur Degradation der Enzyme. Dies könnte auch eine vorübergehende, lokale Erhöhung der Sphingomyelin- und Ceramid-Konzentrationen in den Zellen hervorrufen. Es liegt also nahe, dass die Behandlung der Zellen mit Desipramin oder Sertralin zu einer Veränderung der lysosomalen Membranintegrität führt und somit eine Permeabilitätssteigerung zur Folge hat. Die Versuchsergebnisse zeigen den Nachweis von Cathepsin B (siehe Abbildung 13). Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Desipramin war die Detektion des untersuchten Proteins in der zytosolischen Zellfraktion möglich. Die mit RIPA-Puffer lysierten Zellen dienen hierbei als Positivkontrolle. Cathepsin B, eine Cystein-Protease mit einem Molekulargewicht von 39-42kDa, wird in eine schwere (24-27kDa) und eine leichte Kette (5kDa) gespalten. Es handelt sich bei den abgebildeten Banden um die schwere Kette des Cathepsin B. Die Reproduktivität der Ergebnisse ist jedoch stark eingeschränkt, da Cathepsin B bei stets positiver GAPDH-Ladekontrolle nur in einigen wenigen Versuchswiederholungen detektiert werden konnte. Der Nachweis von Cathepsin D war trotz Modifikationen in der Auswahl der verwendeten Blocksubstanzen, Antikörpern und größerer Proteinmengen nicht erfolgreich. Die Ergebnisse der Immunoblots stützen demnach die fehlende Signifikanz der CA-074 Versuche in Anwesenheit von IL-2. Unklar bleibt jedoch, warum trotzdem ein tendenzieller Effekt des Cathepsin-Inhibitors auf das Sterbeverhalten konventioneller T-Zellen besteht. Eine Koexistenz weiterer Mechanismen, die das Sterben konventioneller T-Zellen begünstigt, ist anzunehmen.

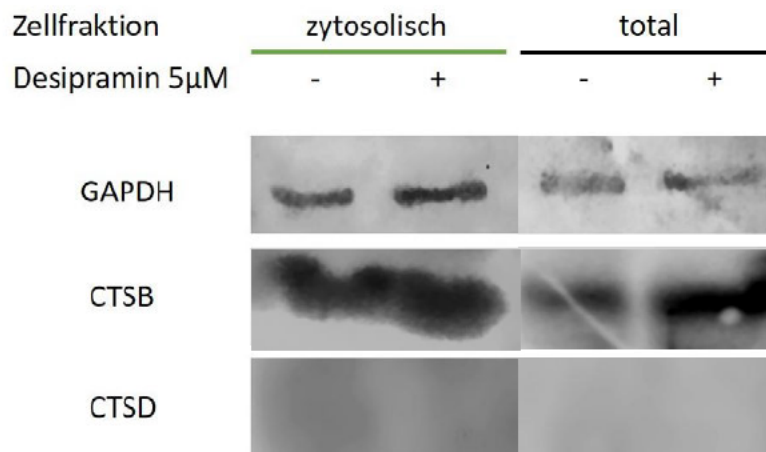


Abbildung 13: Exemplarischer Immunoblot von CD4+ T-Zellen nach Inkubation mit Desipramin. Nach 3-tägiger Inkubation von  $5 \times 10^7$  Desipramin- und IL-2 behandelten CD4+ Zellen werden die zytosolische Zellfraktion mittels Kit aufgetrennt und weitere  $3,5 \times 10^7$  CD4+ Zellen in RIPA Buffer (total) lysiert. Jeweils  $40 \mu\text{g}$  des Lysats werden aufgetragen und im 15%igen Gel aufgetrennt. Der weitere immunologische Nachweis dient zur Detektion von Cathepsin B (CTSB), Cathepsin D (CTSD) und GAPDH als Ladekontrolle. Abgebildet sind die Ergebnisse unterschiedlicher Immunoblots aus insgesamt 6 Versuchen. Sowohl in der zytosolischen Zellfraktion als auch im Gesamtzelllysate konnten Cathepsin B, nicht jedoch Cathepsin D detektiert werden. Cathepsin B kann gleichermaßen in An- und Abwesenheit von Desipramin detektiert werden. Eine unterschiedliche Freisetzung von Cathepsinen in Abhängigkeit von Desipramin kann somit nicht abschließend beurteilt werden.

#### 5.4 Steigerung der lysosomalen Permeabilität durch Inhibition der Asm

Lysosomen beinhalten eine Vielzahl proapoptotisch wirksamer Moleküle wie z.B. die oben erläuterten Cathepsine. Um Apoptose hervorzurufen, ist eine Überwindung der lysosomalen Membranbarriere notwendig. Ist die Durchlässigkeit dieser Barriere erhöht, kommt es zum Austritt von Molekülen aus dem Lysosom in das Zytosol. Folglich können Cathepsine eine mitochondriale Signalkaskade zur Auslösung der Apoptose in Gang bringen (vgl. Abbildung 4).

Ob der Zelltod der Tconv auf einer Steigerung der lysosomalen Permeabilität beruht, sollte durch die Färbung von Zellen mit Acridin-Orange untersucht werden. Da primäre T-Zellen relativ wenig Zytoplasma enthalten und eine Untersuchung der Lysosomen daher schwierig ist, wurde für diese Untersuchung die Zelllinie CTLL2 (Zelllinie zytotoxischer muriner T-Zellen) verwendet. Acridin-Orange ist ein Farbstoff, der Plasmamembranen wie auch Membranen intrazellulärer Vesikel durchqueren kann und sich in Zellkompartimenten mit niedrigem pH-Wert anreichert. In sauren Kompartimenten



erscheint der Farbstoff rot, bei höheren pH-Werten emittiert er grünes Licht. Seine Fluoreszenzwellenlänge ist somit abhängig vom pH-Wert, aber auch von seiner Konzentration; in Lösungen mit hohen Konzentrationen (ca. 100mM) erscheint er als roter, in geringen Konzentrationen (ca. 0,1µM) als grüner Farbstoff. (Brunk *et al.*, 1997; zusammengefasst in Elmore, 2007; Pierzyńska-Mach, Janowski and Dobrucki, 2014). Hier werden jedoch ausschließlich niedrige Konzentrationen eingesetzt.

CTLL-2 Zellen sind aufgrund großer Lysosomen für eine mikroskopische Betrachtung besonders geeignet. Sie werden entweder unbehandelt oder mit 20 µM Desipramin unterschiedlich lang inkubiert, anschließend mit 6,6 µM Acridin-Orange gefärbt und unter dem Konfokalmikroskop betrachtet. Über einen Zeitraum von vier Minuten wird die Entfärbung der Lysosomen und die Steigerung der zytoplasmatischen Farbintensität untersucht. Es erfolgt der Vergleich unbehandelter CTLL-2 Zellen mit Desipramin-behandelten Zellen.

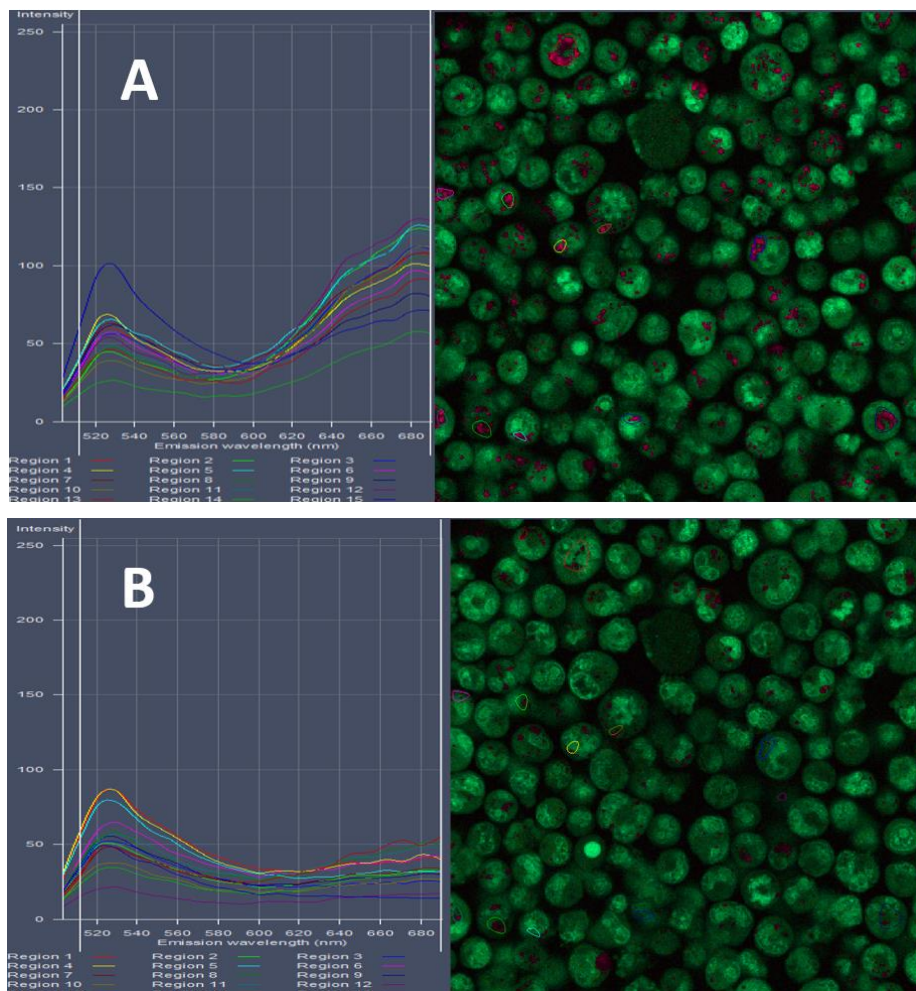


Abbildung 14: Desipramin- und lichtinduzierter Ausstrom von Acridin-Orange Molekülen aus den Lysosomen

*CTLL-2 Zellen ( $10^6$  Zellen) wurden nach einstündiger Inkubation mit Desipramin mit Acridin-Orange gefärbt und mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Zu Beginn der Analyse (A) und nach vier Minuten (B) werden Farbintensitäten saurer Zellkompartimente analysiert. Nach vier Minuten sinkt die rote Farbintensität der Lysosomen, während das grüne Zytoplasma heller erscheint. Die unterschiedlichen farbigen Kurven stellen die ausgewählten Messbereiche dar.*

Da saure Zellkompartimente bei der Färbung mit Acridin Orange rot fluoreszieren und sich vom neutralen Milieu des grün erscheinenden Zytosols abgrenzen (vgl. Abbildung 14), kann die Permeabilität saurer Kompartimente anhand des zeitlichen Verlaufs dargestellt werden. Zu Beginn der Messung (nach null Stunden Inkubationszeit) lässt sich ein starkes rotes Signal und ein im Vergleich dazu geringes grünes Signal erkennen (vgl. Abbildung 16A und A'). Das Rot-zu-grün-Verhältnis gilt hierbei als ein Maß für das Volumen saurer Kompartimente (Thomé et al., 2016). Der Kurvenverlauf der mit Desipramin behandelten und unbehandelten Zellen verläuft nahezu parallel (vgl. Abbildung 16A'). Zu Beginn der Inkubation besteht demnach zwischen behandelten und unbehandelten Zellen kein wesentlicher Unterschied im Rot-zu-grün-Verhältnis. Kurz nachdem Desipramin zugegeben wurde, steigt die LMP der betrachteten CTLL2-Zellen. Die Intensitätsabnahme des roten Farbstoffs geschieht schneller als ohne Desipramin-Behandlung, sichtbar anhand des tiefer verlaufenden, gestrichelten Kurvenverlaufs. Eine Erhöhung der Intensität im grünen Farbspektrum ist jedoch nicht erkennbar (Abbildung 16A). Weiterhin wurde das Emissionsverhalten der Zellen nach einstündiger Inkubation mit Desipramin ermittelt. Bei den unbehandelten Kontrollzellen zeigt sich eine deutliche Intensitätsanhebung im grünen Farbspektrum (Abbildung 16B). Bei den behandelten Zellen hingegen fällt die Intensität sowohl im grünen als auch roten Emissionsspektrum ab. Dies könnte daraufhin deuten, dass die Reaktion bereits vor Beginn der konfokalmikroskopischen Messung stattgefunden hat. Die Aktivierung des Farbstoffs fand also vor Anregung mit blauem Licht statt (Abbildung 16B). Nach einer Stunde (vgl. Abbildung 16B') und noch deutlicher nach zwei Stunden Inkubation (vgl. Abbildung 16C') haben sich die absoluten Fluoreszenzwerte (rote und grüne Kurve) angenähert, das Volumen der sauren Kompartimente hat abgenommen. Die Abnahme des Rot-zu-grün-Verhältnisses ist in Anwesenheit von Desipramin noch deutlicher. Hier liegt die absolute Fluoreszenzintensität der sauren Kompartimente unter dem der nicht-sauren Kompartimente. Bei der zweistündigen Inkubation verlaufen die Kurven der behandelten Zellen ebenfalls flacher als die der Kontrollgruppe (Abbildung 16C). Eine mögliche Erklärung ist, dass sich bei den behandelten Zellen bereits eine Sättigung eingestellt hat, da das Volumen der sauren Kompartimente schon reduziert ist. Andererseits wäre

denkbar, dass aus den Lysosomen behandelter Zellen weniger Farbstoffpartikel diffundieren können als aus den Lysosomen der unbehandelten Zellen. Hier ist die Permeabilität so hoch, dass sich ein Gleichgewicht fast gänzlich eingestellt hat.

Die Ergebnisse legen also nahe, dass sowohl die Inkubationszeit als auch die Behandlung mit Desipramin die LMP beeinflusst und der damit einhergehende Austritt von Acridin Orange aus dem Lysosom zunimmt. Es kommt zur Abnahme des Volumens saurer Kompartimente. Auch bei Niemann-Pick Typ C geht man von einer lysosomalen Störung aus, bei der es zu einer Erhöhung des endolysosomalen pH-Wertes kommt (Tharkeshwar et al., 2017; Wheeler et al., 2019).

Letztlich kann also festgehalten werden, dass die lysosomale Permeabilitätssteigerung bei CTLL-2 Zellen sehr schnell stattfindet und der Farbstoff Acridin-Orange und damit vermutlich auch proapoptotische Proteine bereits nach kurzer Zeit aus den Lysosomen ins Zytosol diffundieren.

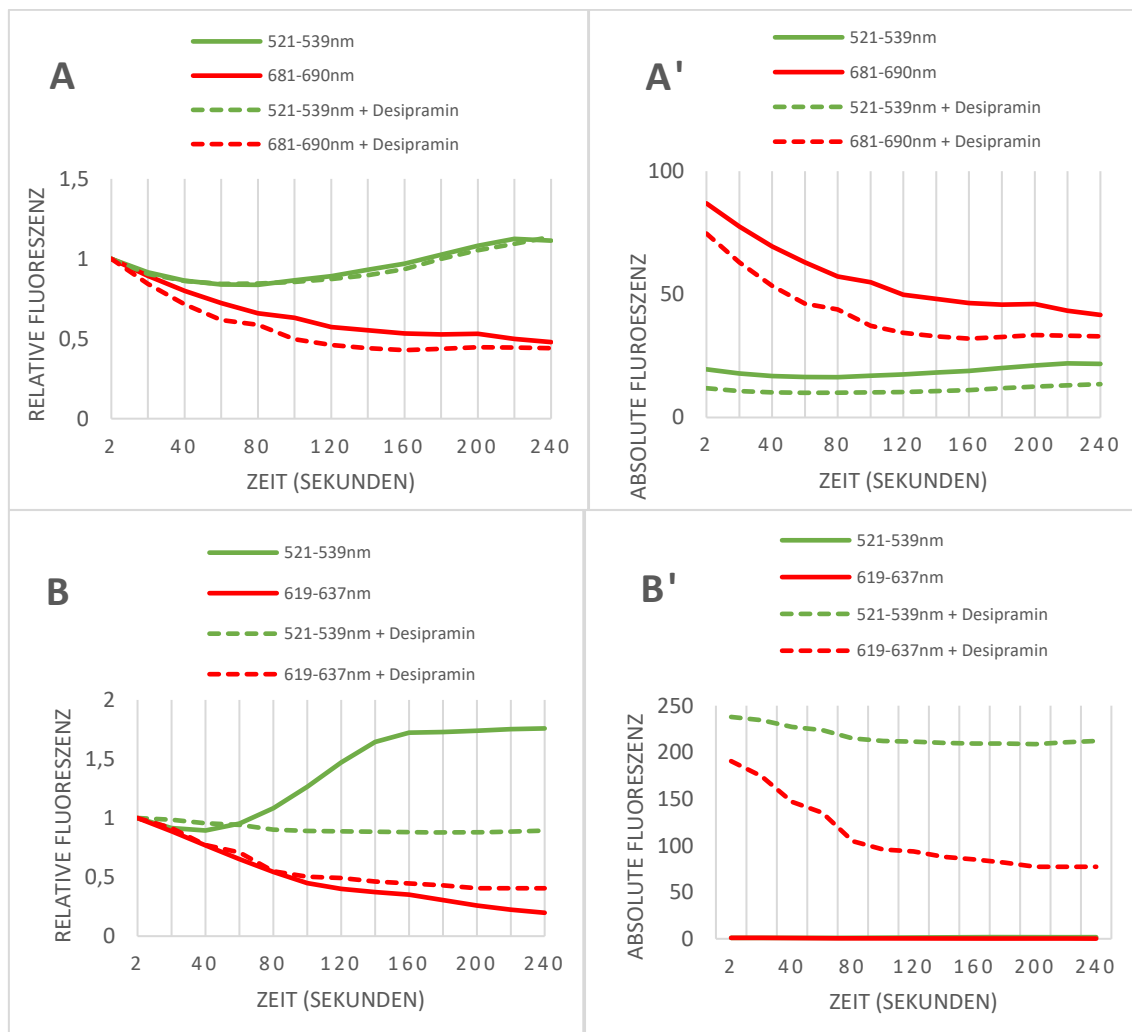


Abbildung 15: Färbung von CTLL2 Zellen mit Acridin Orange mit und ohne Desipramin-Behandlung

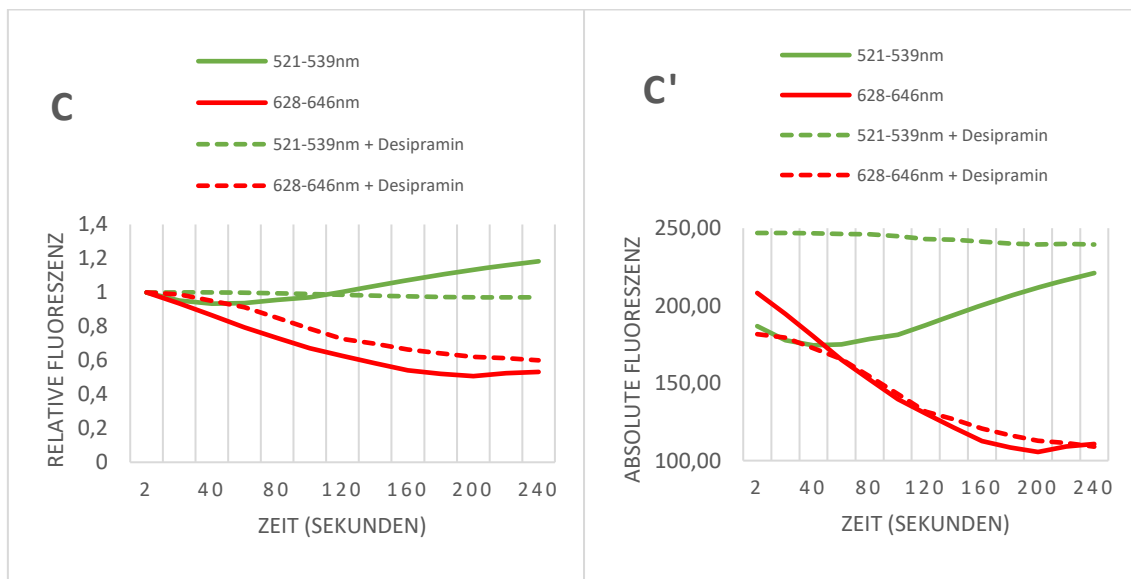


Abbildung 16 (Fortsetzung): Färbung von CTLL2 Zellen mit Acridin Orange mit und ohne Desipramin-Behandlung

CTLL-2 Zellen wurden mit 40  $\mu$ M Desipramin behandelt und mit Acridin-Orange gefärbt. Unter Verwendung der Konfokalmikroskopie wurden die Zellen mit blauem Licht der Wellenlänge 502 nm angeregt. Emissionsspektren aus dem grünen und roten Wellenlängenbereich wurden über einen Zeitverlauf von vier Minuten (1 frame pro 20sec) ermittelt. Um den Einfluss von Desipramin auf die Änderung der Emissionsspektren zu untersuchen, wurden unterschiedlich lange Inkubationszeiten verwendet. Die Abbildungen A'-C' zeigen absolute Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit von der Zeit in Sekunden. Bei den Abbildungen A-C wurden die Daten jeweils auf den Anfangswert = 1 normiert. Bei Färbung unmittelbar nach Zugabe von Desipramin zeigen die behandelten Zellen eine schnellere Ausschüttung des Farbstoffs aus den sauren Zellkompartimenten als die unbehandelten (A). Bei Färbung nach einer (B) oder zwei Stunden (C) zeigt sich der Ausstrom des Farbstoffs aus den Lysosomen der behandelten Zellen verlangsamt gegenüber den unbehandelten Zellen. Das Rot-zu-grün-Verhältnis kehrt sich im Verlauf der Inkubationszeit um (A'-C').

## 6 Diskussion

Es ist hinlänglich bekannt, dass sämtliche Signaltransduktionswege entscheidend durch Proteine gesteuert und reguliert werden. Nicht zu unterschätzen ist jedoch die Relevanz von Lipiden für die Übermittlung intrazellulärer Informationen. Nicht nur deren Gehalt, vor allem die Zusammensetzung und das Gleichgewicht unterschiedlicher Lipide und deren Kommunikation mit Enzymen sind von großer Bedeutung für die Funktion und Integrität von Membranen und damit auch wichtig für die Funktion und Aktivität von Immunzellen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte saure Sphingomyelinase, die als Enzym Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin spaltet und somit an der Vernetzung von protein- und lipidabhängigen Signalwegen beteiligt ist, spielt eine entscheidende Rolle in der T-Zell-abhängigen Immunantwort. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Inhibitoren der Asm Auswirkungen auf das Gleichgewicht von T-Zellpopulationen haben (Hollmann et al., 2016), sollte in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden, welche Mechanismen dem zugrunde liegen und inwiefern weitere Faktoren das Schicksal einer CD4+ T-Zelle beeinflussen. Zu klären ist an dieser Stelle die Frage, ob der Gehalt unterschiedlicher Sphingolipide in der Zellmembran als Resultat biochemischer Prozesse, beispielsweise oxidativem Stress oder Entzündung, hervorgeht oder ob die Modulation von Ceramiden aktiv an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen beteiligt ist.

Genaue Kenntnisse über molekulare intrazelluläre Vorgänge, die zum selektiven Überleben regulatorischer T-Zellen führen, können für die Therapie überschießender Immunreaktionen essenziell sein. Neue Therapiekonzepte gegen Autoimmunerkrankungen wie allergischer Rhinitis, Graft-versus-Host-Disease und Cystischer Fibrose könnten daraus hervorgehen oder bestehende Therapien ergänzen. Vor allem stigmatisierende Erkrankungen wie z.B. Lupus erythematodes kann zu psychischen Begleiterkrankungen führen und könnten mittels Antidepressiva nicht nur symptomatisch, sondern auch kausal behandelt werden. Auf der anderen Seite stellen Asm-Inhibitoren mögliche Ansatzpunkte gegen psychische Erkrankungen mit autoimmuner Komponente, wie z.B. die Alzheimer-Demenz dar.

### 6.1 Asm-Inhibitoren nehmen Einfluss auf das Gleichgewicht von T-Zellpopulationen

Während Desipramin zur Gruppe der trizyklischen Antidepressiva gehört, die heutzutage nur noch als Zweitlinien-Therapie angewandt werden, gilt Sertralin als gängiger Serotonin-Reuptake-Inhibitor, der vor allem zur Therapie von Depressionen sowie

Angst-, Panik- und Zwangsstörungen eingesetzt wird. Sowohl trizyklische Antidepressiva als auch SSRI wirken inhibitorisch, indem sie die Ablösung der Asm und auch der sauren Ceramidase (Elojeimy *et al.*, 2006) von der lysosomalen Membran und ihre anschließende proteolytische Degradation induzieren, was zur Akkumulation von Sphingomyelin und auch Ceramid führen kann (Kölzer, Werth and Sandhoff, 2004; zusammengefasst in Beckmann *et al.*, 2014). Dieser Zellstress führt in CD4+ Foxp3-konventionellen T-Zellen, nicht aber in CD4+ Foxp3+ regulatorischen T-Zellen zur Induktion von Zelltod (vgl. Abbildung 5). Das Sterben der Tconv-Zellen findet dabei konzentrationsabhängig statt: je höher die Asm-Inhibitorkonzentration ist, desto mehr Zellen erliegen dem Zelltod. Eine hier noch nicht untersuchte Möglichkeit zur Induktion des Zelltods in Tconv-Zellen wären durch Ceramid-induzierte Signalkaskaden, z.B. über Interaktion mit PP2A und Hemmung der mTORC1-Aktivität und Stimulation der Foxp3 Expression (Apostolidis *et al.*, 2016). Auffällig ist, dass der potente Asm-Inhibitor ARC39, der kompetitiv die katalytische Aktivität der Asm hemmt, keine Frequenzerhöhung regulatorischer T-Zellen bewirkt. Die Ergebnisse legen nahe, dass das Bisphosphonat zwar ein potenter Asm-Inhibitor ist, jedoch seine Wirkung an der lysosomalen Asm nicht entfalten kann. Eine mögliche Erklärung wäre, dass ARC39 nicht ins Lysosom, dem Ort der höchsten Asm-Aktivität, vordringen kann. Die sekretorische Form der Asm auf der äußeren Zellmembran wird zwar gehemmt, die für den Zelltod der Tconv-Zellen offensichtlich relevante Degradation der lysosomalen Asm dagegen findet nicht statt. Inwiefern ARC39 unter Stress, beispielsweise unter Einfluss von IL-1, UV-Strahlung oder CD95, auf die T-Zellpopulationen wirkt und ob die lysosomale Asm auf die äußere Zellmembran transportiert wird, um dort Ceramid zur Apoptoseinduktion zu produzieren (Hofmeister *et al.*, 1997; Kirschnek, 2000), ist bislang ungeklärt. Ebenso wäre interessant inwiefern sich weitere Bisphosphonate, wie z.B. das zur Therapie der Osteoporose zugelassene Zoledronat, die Asm-Aktivität und das Gleichgewicht von T-Zellen beeinflussen.

Eine präanalytische Beeinflussung der Ergebnisse durch experimentelle Bedingungen ist unwahrscheinlich, da lediglich Sphingosin-1-Phosphat und Sphingamin-1-Phosphat durch Bedingungen wie Temperatur, Zentrifugation und Zeit beeinflusst werden (Brunkhorst *et al.*, 2018). Vielmehr kann das selektive Sterben der Tconv-Zellen dadurch erklärt werden, dass einerseits die anfallenden Sphingomyelin-Moleküle am Endoplasmatischen Retikulum metabolisiert werden, wodurch die Transkriptionsfaktoren ATF4 und CHOP exprimiert werden, die proapoptotisch wirken (Klutzný *et al.*, 2017). Zum anderen ist es möglich, dass die lysosomale

Membranpermeabilität durch die intralysosomale Akkumulation von Sphingomyelin gesteigert wird und es zum Ausstrom von Cathepsinen ins Zytosol kommt, die ihrerseits Apoptose induzieren (zusammengefasst in Schneider-Schaulies and Beyersdorf, 2018). Letzteres muss jedoch aufgrund der fehlenden Signifikanz im Nachweis von Cathepsinen und Caspasen in Frage gestellt werden (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 13). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Zelluntergang konventioneller T-Zellen nicht auf dem Mechanismus der Apoptose beruht. Weitere Zelltodwege wie Nekroptose, Ferroptose oder Methuose müssen hierbei in Betracht gezogen werden.

Ungeachtet des Mechanismus bewirkt die Hemmung der Asm eine Frequenzerhöhung der Treg-Zellen in der Maus und damit auch eine gewisse Immunsuppression. Dies zeigte sich im Masernvirus-Infektionsmodell des ZNS der Maus durch die Zunahme infizierter Zellen (Hollmann *et al.*, 2016). Bei Menschen wurde ein positiver Effekt von Fluoxetin (ein SSRI) bei der Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose beschrieben (Mostert *et al.*, 2008; Mitsonis *et al.*, 2010; Cambron *et al.*, 2014). Ob dieser Effekt auf eine Erhöhung der Treg-Zellfrequenz zurückzuführen ist, ist bislang ungeklärt.

Die Erhöhung der Treg Zellfrequenz durch Hemmung der sauren Sphingomyelinase kann nicht nur die Progression von Autoimmunkrankheiten minimieren, sondern auch zu negativen Folgen für den Organismus führen. So kann es zur Unterdrückung der körpereigenen Abwehr gegen Tumorzellen oder Bakterien, einer zu hohen Toleranz gegenüber Fremdanitigenen und zu Infektionen oder tumorösen Prozessen kommen. Diese Tatsache erschwert wiederum die Chancen einer klinischen Erprobung der Wirksubstanzen im Rahmen einer Immunmodulation. Die Frequenzerhöhung regulatorischer T-Zellen unterdrückt einerseits das körpereigene Immunsystem, andererseits werden gerade Tumorzellen durch die Asm-Inhibition getötet (Arimochi and Morita, 2008; Petersen *et al.*, 2013; Klutzny *et al.*, 2017). Dies stellt eine neue Perspektive in der Krebstherapie dar. Es gilt also, eine Balance zwischen Unterdrückung und Aktivierung des Immunsystems zu finden.

## **6.2 Zelltod konventioneller T-Zellen durch Asm-Inhibition nicht durch Apoptose zu erklären**

Im untersuchten Mausmodell wurde gezeigt, dass Asm-Inhibitoren wie Desipramin oder Sertralin, nicht aber das Bisphosphonat ARC39, die T-Zellfrequenz zugunsten regulatorischer T-Zellen verschiebt. Bei konstanter Anzahl regulatorischer T-Zellen erhöht sich durch den Zelltod konventioneller T-Zellen mit zunehmender Konzentration von Asm-Inhibitoren die Frequenz der regulatorischen T-Zellen (vgl. Abbildung 5). Die

Hypothese, dass das Sterben konventioneller T-Zellen auf Apoptose beruht, wurde durch die Untersuchungen mit Caspase- und Cathepsininhibitoren nicht abschließend verifiziert, obgleich Hinweise für eine partielle Beteiligung von apoptotischen Prozessen bestehen. Bei geringen Asm-Inhibitorkonzentrationen kann eine Protektion der Tconv-Zellen durch die Caspase- und Cathepsin-Inhibitoren nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 8 und Abbildung 12), die jedoch unter Erhöhung der Cathepsin- oder Caspase-Inhibitorkonzentration nicht zunimmt.

Apoptose kann ausgelöst werden, indem die lysosomale Permeabilität gesteigert wird und Cathepsine, die als Stimulus für die mitochondriale Cytochrom c- Ausschüttung fungieren, aus den Lysosomen freigesetzt werden. Fokalmikroskopische Untersuchungen konnten jedoch eine effektive Erhöhung der Permeabilität durch die Asm-Inhibition nicht bestätigen. Die minimale Erhöhung der Permeabilität nach unmittelbarer Färbung (vgl. Abbildung 16A) sowie die Intensitätserhöhung der unbehandelten Zellen in Abbildung 16B sind demnach am ehesten als Artefakte zu werten. Auch mithilfe von Westernblots konnte nach Asm-Inhibition keine Steigerung von Cathepsinen im Zytosol nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der lysosomalen Membranpermeabilität ist die Betrachtung des Chaperons Hsp70 (Heat Shock Protein 70) interessant, welches vor allem auch in der Pathogenese der Nieman-Pick-Krankheit Bedeutung hat. Es bindet an endolysosomales Bismonoacylglycerophosphat (BMP), das ein wichtiger Kofaktor für den Sphingomyelin-Metabolismus im Lysosom darstellt und verringert die lysosomale Membranpermeabilität (Kirkegaard *et al.*, 2010). Dadurch fördert es das Überleben von Zellen, die erhöhtem Zellstress ausgesetzt sind. Eine Analyse der Hsp70 Expression und Verteilung in Asm-inhibierten Tconv-Zellen wäre dahingehend eine weitere Möglichkeit, den Einfluss der Asm-Inhibition auf die lysosomale Membranpermeabilität zu untersuchen.

In Zusammenschau der Ergebnisse sprechen die nicht signifikanten bzw. negative Ergebnisse am ehesten dafür, dass neben Apoptose weitere durch Ceramide hervorgerufene Zelltod-Mechanismen wie Ferroptose oder Pyroptose in Frage kommen. Letztere wurden in Folgeexperimenten untersucht, bei denen die mitochondriale Masse und das mitochondriale Membranpotenzial untersucht wurden. Dabei lagen keine Hinweise auf eine mitochondriale Funktionseinschränkung nach Desipraminbehandlung vor. Dadurch ist anzunehmen, dass auch keine Cytochrom c Freisetzung zur Apoptose- und Nekroptoseinduktion stattfindet. Pyroptose wird neben der Apoptose ebenfalls durch Caspasen ausgelöst. Pyroptoseauslösende inflammatorische Caspasen (Caspase 1, 4, 5 und 11) erfüllen hierbei jedoch sowohl Initiator- als auch Effektorfunktion und benötigen



keine autoproteolytische Aktivität (zusammengefasst in Jorgensen and Miao, 2015). Durch den Pancaspase-Inhibitor ZVAD (vgl. Abbildung 8) wurden pyroptotische Prozesse am ehesten ausgeschlossen.

Durch die Inhibition der Asm kommt es zur Akkumulation von Sphingomyelin im Lysosom. Der dadurch erzeugte Lipid-Stress erzeugt eine Steigerung der lysosomalen Membranpermeabilität und ermöglicht die Diffusion von lysosomalen Molekülen ins Zytosol (zusammengefasst in Ségui *et al.*, 2006; Klutzny *et al.*, 2017). Davon ausgehend sind neben dem apoptotischen Zelltod auch nicht-apoptotische Prozesse wie Nekrose, Pyroptose und Ferroptose denkbar (zusammengefasst in Wang, Gómez-Sintes and Boya, 2018). Ein vielversprechender Ansatz ist der Zelltod durch Ferroptose. Dieser Mechanismus beruht auf der Akkumulation von lipid-reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die zu einer eisenabhängigen oxidativen Schädigung von Membranlipiden und letztlich zum Zelltod führt. Eisen wird dabei physiologisch durch den Transferrin-Rezeptor an Transferrin gebunden vom Lysosom internalisiert und von dort aus ins Zytosol freigesetzt (zusammengefasst von Magtanong and Dixon, 2020). Durch eine Asm-Inhibitor-induzierte LMP könnte weiteres freies Eisen ins Zytosol diffundieren, welches dort an der Fenton-Reaktion teilnimmt. Die aus dieser Reaktion hervorgehenden Hydroxylradikale reagieren mit mehrfach ungesättigten Acylketten in Membranphospholipiden. Die entstandenen Lipidradikale reagieren leicht mit Sauerstoff, wodurch hochreaktive Lipidperoxyradikale aus benachbarten Phospholipiden Protonen abstoßen, die wiederum weitere Lipidperoxide bilden. Letztendlich kommt es zur ausgeprägten Schädigung von Membranlipiden (Dixon *et al.*, 2012; Shah, Shchepinov and Pratt, 2018; zusammengefasst in Magtanong and Dixon, 2020). Die Ausbildung von hochreaktiven Lipidperoxide wird physiologisch durch die Aktivität der Glutathionhydroperoxidase 4 (GPX4) durch Reduktion zu nicht-reaktiven Lipidalkoholen verhindert. Maßgeblich für die Funktion des Enzyms ist das Glutamat/Cystin Antiporter System  $x_c^-$ , da Cystein das geschwindigkeitsbestimmende Substrat bei der Glutathion-Biosynthese ist. Durch direkte Hemmung der GPX4 oder indirekt durch Senkung des Glutathionspiegels wird Ferroptose induziert. Um den Einfluss von Ferroptose auf den Asm-Inhibitor-assoziierten Zelltod von konventionellen T-Zellen zu untersuchen, wäre es also interessant, ob Asm-Inhibitoren wie Desipramin einerseits die Eisenkonzentration im Zytosol erhöhen, andererseits die Aktivität von GPX4 und den Glutathionspiegel in Tconv-Zellen beeinflussen. Eine Steigerung der GPX4-Aktivität wäre hinweisend darauf, dass es zu einem massiven Eisen-Efflux aus dem Lysosom kommt und die enzymatische Aktivität die Eisentoxizität nicht ausreichend regulieren kann. Eine

verringerte GPX4-Aktivität dagegen wäre durch eine direkte Hemmung durch Asm-Inhibitoren oder durch Beeinflussung der Glutathion-Biosynthese zu erklären.

Im Gegensatz dazu hat eine Studie zu Glutamat-induzierter Ferroptose in Oligodendrozyten festgestellt, dass die Inhibierung der Asm das Überleben von Oligodendrozyten begünstigt. Glutamat induziert hierbei eine Asm-Aktivierung und war mit einem verminderten Glutathionspiegel assoziiert (Novgorodov *et al.*, 2018). Diese Beobachtungen sind zwar genau gegensätzlich der oben aufgestellten Hypothese, dass Asm-Inhibitoren Ferroptose induzieren. Ob die Wirkung auf Oligodendrozyten des ZNS auch auf CD4+ Immunzellen projiziert werden kann, ist bisher jedoch noch nicht untersucht. Novgorodov *et al.* beweisen jedenfalls einen Zusammenhang zwischen Ferroptose und der Aktivität der sauren Sphingomyelinase.

### **6.3 IL-2 schützt regulatorische T-Zellen vor dem Zelltod**

Die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) gilt gemeinsam mit CD4 und Foxp3 als Oberflächenmarker für regulatorische T-Zellen. Tregs konkurrieren dabei mit aktivierten T-Effektorzellen um das Zytokin IL-2. Setzt man CD4+ T-Zellen einer Asm-Inhibition aus, so verringert sich die Anzahl konventioneller T-Zellen, während die Population der CD25+ regulatorischen T-Zellen unverändert bleibt. Außerdem überleben unter IL-2-Einfluss generell mehr Zellen als in Abwesenheit von IL-2. Da Treg mehr CD25 exprimieren als andere T-Zellen, überleben bzw. proliferieren sie unter IL-2-Einfluss besser als andere T-Zellen (Kaltenberg *et al.*, 2010; Koreth *et al.*, 2011).

Trägt die Asm-Induktion zur Steigerung der lysosomalen Membranpermeabilität bei, könnte diese durch IL-2 verhindert werden. Folglich werden weniger proapoptotisch wirksame Moleküle ins Zytosol freigesetzt und die CD25<sup>high</sup> positiven Tregs sind vor Apoptose geschützt. Nachdem die durchgeführten Versuche jedoch keine Veränderungen der lysosomalen Membranpermeabilität durch Asm-Inhibitoren zeigen konnten, liegt es nahe, dass auch die IL-2-Protektion auf einem anderen Mechanismus beruht.

Eine mögliche Erklärung für das selektive Überleben von Tregs unter IL-2 könnten Faktoren in den IL-2 Signalkaskaden sein, die einem Absterben der Zellen entgegenwirken. Ein hier betrachteter Faktor ist der Signaltransduktor STAT5. Aus den Ergebnissen (vgl. 5.2) lässt sich schließen, dass die Treg-Zellen nicht aufgrund von IL-2 vermittelter STAT5-Aktivierung vor dem Zelltod geschützt sind. Vielmehr muss dieser Schutzmechanismus eine andere Ursache haben, die in der IL-2 Signalkaskade nach STAT5 liegt. Über 80% der IL-2 vermittelten Signalkaskaden sind abhängig von

Januskinasen, insbesondere Jak1 und Jak3 (zusammengefasst in Mahmud, Manlove and Farrar, 2013; zusammengefasst in Villarino, Kanno and O'Shea, 2017). Denkbar wäre also, dass die Regulation von Januskinasen für das IL-2-abhängige Überleben regulatorischer T-Zellen verantwortlich ist.

Zu diskutieren ist darüber hinaus die Beteiligung von FoxO family members. Der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) Signalweg spielt eine herausragende Rolle in der Vermittlung von Überlebenssignalen. IL-2 reguliert in T-Zellen die Phosphorylierung von FoxO3 über den PI3K-Signalweg. Im phosphorylierten Zustand ist der potente Apoptoseinduktor FoxO3 inaktiv (Stahl *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2011). Da regulatorische T-Zellen eine höhere Dichte an IL-2-Rezeptoren besitzen, führt IL-2 somit zum selektiven Überleben von regulatorischen T-Zellen, während bei fehlendem CD25-Rezeptor (bei >97% der Tconv-Zellen nicht exprimiert) der Asm-Inhibitor-induzierte Zelltod ausgelöst wird.

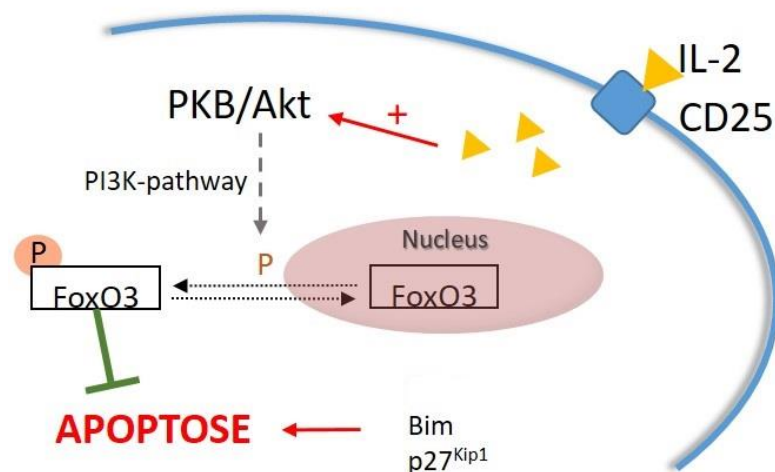


Abbildung 17: IL-2 schützt regulatorische T-Zellen durch Phosphorylierung von FoxO3 vor dem Zelltod

Regulatorische T-Zellen besitzen den charakteristischen CD25-Rezeptor und binden damit hochaffin IL-2. Dieses aktiviert die Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase B (PKB) und phosphoryliert über den Phosphatidylinositol 3-kinase Signalweg (PI3K-pathway) das Forkhead-Box-Protein O3 (FoxO3) und inaktiviert es damit. Im dephosphorylierten Zustand dient es als Transkriptionsfaktor für proapoptotische Proteine, darunter Bim aus der Bcl-2 Familie und den cdk-Inhibitor p27Kip1. Somit führt IL-2 zur Protektion CD25<sup>high</sup> positiver regulatorischer T-Zellen. Angelehnt an Stahl *et al.*, 2002; Peng, 2008 und Zhang *et al.*, 2011.

Um sich vor dem Zelltod zu schützen, nutzen Zellen die Autophagie, bei der veränderte Proteine und Organellen durch Autophagosomen sequestriert, zu zelleigenen Lysosomen transportiert und dort caspase-unabhängig degradiert werden. Voraussetzung dafür sind eine kontinuierliche Proteinsynthese und die Anwesenheit von ATP (zusammengefasst in Elmore, 2007; Murphy and Weaver, 2018). Autophagozytische Mechanismen verhindern unkontrolliertes Zellwachstum sowie die Auslösung von Apoptose, indem die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien unterbunden wird (Lemasters *et al.*, 1998). Als katabolischer Prozess, der durch eine Vielzahl von Stressfaktoren aktiviert wird, degradiert sie Proteine, oxidierte Lipide sowie beschädigte Organellen und intrazelluläre Erreger. Deren Abbauprodukte wiederum nutzt die Zelle je nach Bedarf zur Generierung neuer Komponenten (zusammengefasst in Ségui *et al.*, 2006; zusammengefasst in Settembre *et al.*, 2013). Es wurde gezeigt, dass die Inhibition der Asm zu einer Erhöhung des transcription factor EB (TFEB) und damit zur Induktion von Autophagie führt (zusammengefasst in Settembre *et al.*, 2013; Justice *et al.*, 2018). Dadurch wird die mögliche Relevanz der Asm-Inhibitor getriggerten Autophagie hinsichtlich des Zellschicksals von Treg-Zellen deutlich. Eine Untersuchung von Autophagie-auslösenden Mechanismen in Treg- gegenüber Tconv-Zellen wäre hierzu wegweisend.

Eine weitere Erklärung für das selektive Überleben von Treg-Zellen gegenüber Tconv-Zellen nach pharmakologischer Asm-Inhibition ist die erhöhte Aktivität der Asm in Treg-Zellen (Hollmann *et al.*, 2016). Durch die erhöhte Aktivität sind höhere Inhibitorkonzentrationen notwendig, um auch regulatorische T-Zellen dem Sphingomyelin-Stress auszusetzen, der schließlich zur Induktion von ATF4 und CHOP führt und eine proapoptotische Stressantwort auslöst (Klutznny *et al.*, 2017) (vgl. Abbildung 9).

Des Weiteren lässt sich der Einfluss von Zink auf das Überleben regulatorischer T-Zellen diskutieren. Zink wird nach Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor aus dem Lysosom freigesetzt und inhibiert die ERK- und MEK-Dephosphorylierung, wodurch diese aktiviert werden. Dieser Zink-gesteuerte Mechanismus trägt zur IL-2-abhängigen Proliferation von T-Zellen bei. Da der IL-2-Rezeptor vor allem auf regulatorischen T-Zellen exprimiert wird, trägt IL-2 somit zum spezifischen Überlebenssignal bei. Interessant wäre eine zukünftige Untersuchung, inwiefern die höhere Aktivität der Asm in regulatorischen T-Zellen einen höheren Efflux von Zink ins Zytoplasma bewirkt und somit überlebensfördernd wirkt.

CTLA-4 gilt als zentrales Effektormolekül regulatorischer T-Zellen. Es löst kostimulatorische Moleküle von Antigen-präsentierenden Zellen und dämpft somit die T-Zellantwort (zusammengefasst in Schneider-Schaulies and Beyersdorf, 2018). Es wurde gezeigt, dass die Expression von CTLA-4 und damit die Suppressivität regulatorischer T-Zellen bei Asm-defizienten Mäusen erhöht ist (Hollmann *et al.*, 2016). CTLA-4 senkt außerdem die Treg-Zell-Proliferation (Paterson *et al.*, 2015). Es ist also davon auszugehen, dass die gleichbleibende Anzahl regulatorischer T-Zellen nicht dadurch zustande kommt, dass kompensatorisch Treg-Zellen produziert werden. Vielmehr beruhen die Zahlenverhältnisse auf einem Schutz bestehender Treg-Zellen.

#### **6.4 Hypoxie-induzierte Immunmodulation zugunsten regulatorischer T-Zellen**

Der Sauerstoffbedarf und Sauerstoffverbrauch einer Zelle wird entscheidend über Hypoxia-inducible factors (HIFs) gesteuert. Diese Transkriptionsfaktoren reagieren auf Änderungen des Sauerstoffgehalts in der Zelle, indem sie über 40 Gene regulieren, die im Rahmen von Erythropoese, Angiogenese und metabolischen Prozessen zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung beitragen. Beispielsweise werden die Transkription unterschiedlicher Wachstumsfaktoren wie Erythropoetin und dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) sowie die Expression von Glucosetransportern und glykolytischen Enzymen reguliert (*HIF-1 $\alpha$  pathway* | Abcam, no date; Percy *et al.*, 2008). HIF-1 $\alpha$ , eine von drei Isoformen des Hypoxia-inducible factors, ist unter Normoxie hydroxyliert und wird durch das von-Hippel-Landau-Protein degradiert und schließlich durch Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut. Unter hypoxischen Bedingungen wird die Hydroxylierung des Transkriptionsfaktors gehemmt, wodurch es zur Interaktion von HIF-1 $\alpha$  mit seinen Zielgenen kommt (Percy *et al.*, 2008). Darüber hinaus wird HIF-1 $\alpha$  sauerstoffunabhängig im Zytoplasma von Hsp90 gebunden und somit stabilisiert (*HIF-1 $\alpha$  pathway* | Abcam, no date).

Viele solide Tumoren haben die Eigenschaft, hypoxische Areale zu bilden, um dort durch die hohe Expression von HIFs die Neovaskularisation und Proliferation des Tumors zu fördern (Klutzný *et al.*, 2017). Im Rahmen eines möglichen therapeutischen Ansatzes wurde bereits gezeigt, dass der Asm-Inhibitor Fluphenazin spezifisch in hypoxischen Zellen, nicht aber unter Normoxie, Zelltod induzieren kann (Klutzný *et al.*, 2017). In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, inwiefern der Sauerstoffgehalt den Asm-Inhibitor-induzierten selektiven Zelltod konventioneller T-Zellen beeinflusst. Es zeigte sich, dass die Anwesenheit von HIF-1 $\alpha$  sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Effekte

hat. Einerseits nimmt die Anzahl konventioneller T-Zellen unter dem Einfluss von DMOG mit zunehmender Desipramin-Konzentration weniger stark ab (Abbildung 11C), andererseits ist in Anwesenheit von HIF-1 $\alpha$  die Zahl der Tconv generell geringer. Letzteres führt zu einer signifikant höheren Frequenz der Treg-Zellen unter dem Einfluss von HIF-1 $\alpha$  im Vergleich zu den wildtypischen Zellen (Abbildung 11A). Dies führt zu der Annahme, dass Hypoxie und Lipidstress, erzeugt durch Asm-Inhibition, Zelltod begünstigt. Die Versuche zeigen sogar, dass schon das alleinige Auftreten von Hypoxie ohne den Einfluss von Asm-Inhibitoren zu einer signifikant erhöhten Treg-Frequenz führt. Durch dieses Phänomen ließe sich erklären, dass hypoxische Tumoreale nicht nur zur Ausbildung neuer Gefäße und damit zur Proliferation und zum Progress der Erkrankung führen. Ebenso dient die Herabregulierung des Immunsystems dazu, dass die körpereigene Bekämpfung des Tumors erschwert wird. Umgekehrt ließe sich aus diesem Modell ein neuer Therapieansatz gegen solide Tumoren ableiten: gelingt es, eine Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  in den hypoxischen Arealen des Tumors zu erzielen, so wird es durch die oben genannten Abbauprozesse inhibiert. Der relative Anteil konventioneller T-Zellen gegenüber regulatorischen T-Zellen wird erhöht und das Tumorstadium wird gehemmt, indem die Transkription von Wachstumsfaktoren sowie die Expression von Glucosetransportern und glykolytischen Enzymen reguliert werden.

HIF-1 $\alpha$  ist darüber hinaus in der Lage durch Ubiquitinierung den Transkriptionsfaktor Foxp3 zu inhibieren. Dazu erkennt das Proteasom spezifisch Lysinreste des Transkriptionsfaktors. An diesem Lysinrest kann es jedoch auch zur Acetylierung von Foxp3 kommen, was wiederum seine Stabilität erhöht (zusammengefasst in Dominguez-Villar and Hafler, 2018). In den durchgeführten Experimenten kann davon ausgegangen werden, dass insgesamt die Stabilität des in Treg-Zellen exprimierten Foxp3 hoch ist und es dadurch zur Frequenzsteigerung durch Hypoxie gegenüber konventionellen T-Zellen kommt. Eine Analyse des Acetylierungsgrads in Treg-Zellen würde dahingehend Aufschluss geben.

Bezüglich des Einflusses von HIF-1 $\alpha$  auf die Entwicklung und Funktion von regulatorischen T-Zellen herrscht Uneinigkeit. Einerseits wird berichtet, dass durch HIF-1 $\alpha$  (und ROR $\gamma$ t) die Expression von IL-17 und die Differenzierung von Th17-Zellen gefördert, die Entwicklung von Foxp3<sup>+</sup> Treg-Zellen hingegen unterbunden wird (zusammengefasst in Singh *et al.*, 2016). Dies würde bedeuten, dass unter hypoxischen Bedingungen die Immunantwort zugunsten einer konventionellen T-Zellantwort verschoben würde und steht somit im Widerspruch zu den hier beobachteten Befunden.

Auf der anderen Seite wurde am Beispiel von Jurkat T-Zellen sowie menschlichen und murinen mononukleären Zellen gezeigt, dass durch Hypoxie induziertes HIF-1 $\alpha$  die Expression von Foxp3 steigert (Ben-Shoshan *et al.*, 2008; Clambey *et al.*, 2012; zusammengefasst in Hsu and Lai, 2018). Eine HIF-1 $\alpha$ -Expression in dendritischen Zellen oder Tumorzellen fördert die Expansion von Treg-Zellen. HIF-1 $\alpha$  defiziente dendritische Zellen sind nicht in der Lage, Foxp3<sup>+</sup> Treg-Zellen im Kolon zu induzieren. Hypoxie in Tumoren fördert die Sekretion von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  zur Bildung von Foxp3 (Hsu and Lai, 2018).

Die durch Hypoxie hervorgerufene Expression von HIF-1 $\alpha$  führt zu einer signifikant höheren Frequenz regulatorischer T-Zellen in Anwesenheit des PHD3-Inhibitors DMOG (Abbildung 11), da zum einen die Expression von Foxp3 und damit die Differenzierung regulatorischer T-Zellen induziert wird. Zum anderen führen Hypoxie und Lipidstress, hervorgerufen durch den Asm-Inhibitor Desipramin, gemeinsam zum Zelltod konventioneller T-Zellen. Geht man von einem insgesamt positiven Einfluss von HIF-1 $\alpha$  auf die Differenzierung von Treg-Zellen aus, so spielt die Herabregulierung von HIF-1 $\alpha$  in Treg-Zellen z.B. in der Therapie gegen Autoimmun- oder Infektionserkrankungen eine entscheidende Rolle.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die saure Sphingomyelinase eine wichtige Funktion in T-Zellen erfüllt. Die Funktion und Regulierung der Asm stellt eine herausragende Schnittstelle zwischen lipid- und proteinabhängiger Signaltransduktion in der T-Zell-vermittelten Immunantwort dar. Sie sorgt für eine Balance zwischen Immunabwehr und -toleranz. Eine Vielzahl an trizyklischen Antidepressiva und SSRI inhibieren die Asm und führen zu einer Modulation des T-Zellkompartiments, indem das relative Verhältnis von Tconv und Treg zugunsten der Treg-Zellen verschoben wird. Es wurde gezeigt, dass es sich beim Asm-Inhibitor-vermittelten Zelltod konventioneller T-Zellen nicht um Apoptose durch Freisetzung von Cathepsinen aus den Lysosomen handelt. Vielmehr muss der Einfluss von nicht-apoptotischen Zelltodwegen, vor allem von Ferroptose untersucht werden. Ebenso muss die Hypothese, dass es durch Asm-Inhibitoren zur Erhöhung der lysosomalen Membranpermeabilität kommt, hinterfragt werden. Ungeklärt bleibt der Mechanismus des IL-2 vermittelten Schutz von Treg-Zellen gegenüber dem Asm-Inhibitor-vermittelten Zelltod. Die komplexe Regulation regulatorischer T-Zellen geschieht nicht nur durch die Asm, sondern auch durch den Einfluss von Hypoxie. Der Hypoxie-induzierbare Faktor

HIF-1 $\alpha$  allein erhöht signifikant die Frequenz regulatorischer T-Zellen. Zusammen mit Asm-Inhibitoren führt sie zu erhöhtem Zellstress und zum Untergang von Tconv-Zellen. Inwiefern die Modulation des T-Zellverhältnisses durch trizyklische Antidepressiva therapeutisch zur Behandlung von Tumoren und Autoimmunerkrankungen bei Menschen genutzt werden kann, muss weiter untersucht und diskutiert werden. Hierzu wären Studien mit Depressionspatienten und Autoimmunerkrankungen sinnvoll, deren regulatorische und konventionelle T-Zellen vor und nach Behandlung mit Asm-Inhibitoren untersucht werden.



## 7 Zusammenfassung

Die saure Sphingomyelinase (Asm) ist ein lysosomales Enzym, das sezerniert werden kann und die Reaktion von Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphocholin katalysiert. Seine Funktion ist bedeutsam für die Aufrechterhaltung des zellulären Lipidstoffwechsels und für die Integrität der Plasmamembran. Enzymdefekte sind an der Pathogenese von Infektionen und zahlreichen Stoffwechselerkrankungen wie z.B. der Niemann-Pick-Krankheit, Diabetes mellitus Typ II und auch an der Entstehung psychischer Erkrankungen beteiligt.

Immunologisch bedeutsam ist, dass durch Hemmung der Asm mit trizyklischen Antidepressiva (TZA) oder Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRI) die Frequenz CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen (Treg) der Maus erhöht wird. Grund für die Frequenzerhöhung ist jedoch nicht die Erhöhung der absoluten Treg-Zellzahl, sondern das selektive Sterben CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> konventioneller T-Zellen (Tconv). Erstaunlicherweise führt die Behandlung mit dem kompetitiven Asm-Inhibitor ARC39, einem Bisphosphonat, nicht zu diesem Effekt.

Es konnte gezeigt werden, dass IL-2 die regulatorischen T-Zellen vor dem durch Asm-Hemmung induziertem Zelltod schützt. In Abwesenheit von IL-2 gehen auch Treg-Zellen durch die Asm-Inhibition zugrunde. Treg-Zellen exprimieren konstitutiv CD25, den IL-2-Rezeptor, dessen  $\alpha$ -Kette die Bindungsstelle von Interleukin-2 bildet. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette des Rezeptors sind an der Bindung des Transkriptionsfaktors STAT5 beteiligt, das wiederum die Gentranskription von antiapoptotischen Proteinen wie bcl-2 und bcl-x sowie CD25 fördert. Dahingehend wurde versucht, den verantwortlichen Faktor für den Schutz von Treg-Zellen vor dem Zelltod in der IL-2-Signaltransduktion zu identifizieren. Der Transkriptionsfaktor STAT5 konnte hierbei ausgeschlossen werden. Weder die genetische Überexpression noch die Defizienz von STAT5 hatten Einfluss auf das T-Zell-Gleichgewicht. Die genauen molekularen Mechanismen der Treg-spezifischen IL-2-Protektion bleiben daher ungeklärt. Zu diskutieren sind der Einfluss von Zn<sup>2+</sup>-Ionen, Januskinasen und Mitgliedern der FoxO-Familie.

Die zugrundeliegende Hypothese, dass das spezifische Sterben konventioneller T-Zellen auf einer Erhöhung der lysosomalen Membranpermeabilität (LMP) besteht, woraufhin proapoptotisch wirksame Cathepsine ins Zytosol freigesetzt werden und Caspasen zur Auslösung von Apoptose führen, konnte nicht abschließend bestätigt werden. Jedoch wurde nachgewiesen, dass durch Inhibition von Cathepsinen das Sterben konventioneller T-Zellen in Abwesenheit von IL-2 verlangsamt wird. Eine Protektion der Tconv-Zellen durch Caspase-Inhibitoren kann nur bei hohen

Konzentrationen des Inhibitors ZVAD bei gleichzeitig geringer Asm-Inhibitor-Konzentration erreicht werden. In Zusammenschau der Ergebnisse müssen weitere Formen des Zelltods neben der Apoptose, etwa eine durch Asm-Inhibition induzierte Ferroptose, in Erwägung gezogen werden.

Neben dem durch Asm-Inhibition erzeugten Lipidstress begünstigt das Vorliegen von hypoxischen Bedingungen die Induktion von Zelltod. Schon das alleinige Auftreten von Hypoxie ohne den Einfluss von Asm-Inhibitoren führt zu einer Treg-Frequenzerhöhung. Der Hypoxie-induzierte Faktor HIF-1 $\alpha$  induziert die Expression von Foxp3, wodurch die Differenzierung und Suppressivität von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg-Zellen gefördert wird. Der Einfluss von Hypoxie spielt womöglich vor allem in der Tumorthherapie eine entscheidende Rolle. HIF-1 $\alpha$  regt hypoxische, nicht-vaskularisierte Tumoreale zur Neovaskularisation an und bremst durch die Frequenzerhöhung regulatorischer T-Zellen die eigene Immunabwehr. Ein Abbau des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  stellt somit eine therapeutische Option in der Therapie solider Tumoren dar.

Abschließend lässt sich also festhalten, dass die relative Frequenzerhöhung regulatorischer T-Zellen durch Asm-Inhibition nicht durch Apoptose erklärt werden kann, sondern alternative Erklärungsmodelle wie z.B. die Ferroptose in Betracht gezogen werden müssen. Die Protektion CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen beruht auf der Wirkung von IL-2 und wird durch Hypoxie positiv beeinflusst. Eine genaue Identifizierung der für den Zelltod relevanten Mechanismen ist erforderlich, um sichere therapeutische Maßnahmen im Rahmen von Infektionen und Autoimmunkrankheiten zu etablieren.

## 8 Summary

The acid sphingomyelinase (Asm) is a lysosomal enzyme that can be secreted and catalyses the cleavage of sphingomyelin to ceramide and phosphocholine. Its function is important for the maintenance of cellular lipid metabolism and for the integrity of the plasma membrane. Enzyme defects are involved in the pathogenesis of infections and numerous metabolic diseases such as Niemann-Pick disease, diabetes mellitus type II and also in the development of mental illness.

It is of immunological importance that the inhibition of the Asm with tricyclic antidepressants (TCA) or serotonin reuptake inhibitors (SSRI) leads to an increase of the frequency of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Treg) in the mouse. The reason for this frequency increase is not an increase in the absolute Treg cell count, but rather due to the selective death of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> conventional T cells (Tconv). Surprisingly, treatment with the competitive Asm-inhibitor ARC39, a bisphosphonate, does not lead to this effect.

It could be demonstrated that IL-2 protects regulatory T cells from cell death induced by Asm inhibition. In the absence of IL-2, Treg cells also die due to Asm inhibition. Treg cells constitutively express CD25, the IL-2 receptor, whose  $\alpha$ -chain forms the binding site of interleukin-2. The  $\beta$ - and  $\gamma$ -chain of the receptor are involved in the binding of the transcription factor STAT5, which itself promotes gene transcription of anti-apoptotic proteins such as bcl-2 and bcl-x as well as CD25. Therefore, we tried to identify the responsible factor responsible for protecting Treg cells from cell death in IL-2 signal transduction. The transcription factor STAT5 was excluded. Neither the genetic over-expression nor the deficiency of STAT5 had any influence on the T-cell balance. The exact molecular mechanisms of Treg specific IL-2 protection remain unexplained. The influence of Zn<sup>2+</sup> ions, Janus kinases and FoxO-family members will be discussed.

The underlying hypothesis that the specific death of conventional T cells is based on an increase in lysosomal membrane permeability (LMP), whereupon proapoptotic cathepsins are released into the cytosol and caspases lead to the induction of apoptosis could not be conclusively confirmed. However, it has been shown that inhibition of cathepsins slows down the death of conventional T cells in the absence of IL-2. A protection of Tconv cells by caspase inhibitors can only be achieved at high concentrations of the inhibitor ZVAD with simultaneously low Asm inhibitor concentrations. In summary, other forms of cell death besides apoptosis, such as ferroptosis induced by Asm inhibition, need to be considered.

Besides lipid stress induced by Asm inhibition, the presence of hypoxic conditions favors the induction of cell death. Even the mere occurrence of hypoxia without the influence of Asm inhibitors leads to an increase in Treg frequency. Hypoxia-induced factor HIF-1 $\alpha$  induces Foxp3 expression, promoting differentiation and suppressiveness of CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg cells. The influence of hypoxia possibly plays a decisive role especially in tumor therapy. HIF-1 $\alpha$  stimulates hypoxic, non-vascularized tumor areas to neovascularize and slows down the own immune defense by increasing the frequency of regulatory T cells. A degradation of the transcription factor HIF-1 $\alpha$  is therefore a therapeutic option in the therapy of solid tumors.

In conclusion, it can be stated that the relative frequency increase of regulatory T cells by Asm inhibition cannot be explained by apoptosis, but alternative explanation models such as ferroptosis must be considered. The protection of CD25+ regulatory T cells is based on the effect of IL-2 and is positively influenced by hypoxia. A precise identification of the mechanisms relevant for cell death is necessary to establish safe therapeutic measures in the context of infections and autoimmune diseases.

## 9 Literaturverzeichnis

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. (2018) *Cellular and Molecular Immunology*. 9th edn. Elsevier.
2. Airola, M. V. and Hannun, Y. A. (2013) 'Sphingolipid Metabolism and Neutral Sphingomyelinases', in, pp. 57–76. doi: 10.1007/978-3-7091-1368-4\_3.
3. Aktories, K. *et al.* (2017) *Pharmakologie und Toxikologie*. 12th edn. Elsevier.
4. Albouz, S. *et al.* (1981) 'Tricyclic antidepressants induce sphingomyelinase deficiency in fibroblast and neuroblastoma cell cultures.', *Biomedicine / [publiee pour l'A.A.I.C.I.G.]*, 35(7–8), pp. 218–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6285997> (Accessed: 14 June 2019).
5. Amboss (2019) *Antidepressiva*. Available at: [https://www.amboss.com/de/library#xid=\\_N05dg&anker=Z5a520a1edf9d81387a5fe310f0dbdd25](https://www.amboss.com/de/library#xid=_N05dg&anker=Z5a520a1edf9d81387a5fe310f0dbdd25) (Accessed: 8 December 2019).
6. Apostolidis, S. A. *et al.* (2016) 'Phosphatase PP2A is requisite for the function of regulatory T cells', *Nature Immunology*, 17(5), pp. 556–564. doi: 10.1038/ni.3390.
7. Arimochi, H. and Morita, K. (2008) 'Desipramine Induces Apoptotic Cell Death through Nonmitochondrial and Mitochondrial Pathways in Different Types of Human Colon Carcinoma Cells', *Pharmacology*, 81(2), pp. 164–172. doi: 10.1159/000111144.
8. Beckmann, N. *et al.* (2014) 'Inhibition of acid sphingomyelinase by tricyclic antidepressants and analogons.', *Frontiers in Physiology*, 5, p. 331. doi: 10.3389/fphys.2014.00331.
9. Ben-Shoshan, J. *et al.* (2008) 'Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ', *European Journal of Immunology*, 38(9), pp. 2412–2418. doi: 10.1002/eji.200838318.
10. Beyersdorf, N. and Müller, N. (2015) 'Sphingomyelin breakdown in T cells: role in activation, effector functions and immunoregulation', *Biological Chemistry*, 396(6–7), pp. 749–758. doi: 10.1515/hsz-2014-0282.
11. Bienias, K. *et al.* (2016) 'Regulation of sphingomyelin metabolism', *Pharmacological Reports*, 68(3), pp. 570–581. doi: 10.1016/j.pharep.2015.12.008.
12. Brunk, U. T. *et al.* (1997) 'Photo-oxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts.', *Free radical biology & medicine*, 23(4), pp. 616–26. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9215807> (Accessed: 14 June 2019).
13. Brunkhorst, R. *et al.* (2018) 'Preanalytical Biases in the Measurement of Human Blood Sphingolipids', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), p. 1390. doi: 10.3390/ijms19051390.
  14. Cambron, M. *et al.* (2014) 'Fluoxetine in Progressive Multiple Sclerosis (FLUOX-PMS): study protocol for a randomized controlled trial', *Trials*, 15(1), p. 37. doi: 10.1186/1745-6215-15-37.
  15. Clambey, E. T. *et al.* (2012) 'Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(41), pp. E2784–E2793. doi: 10.1073/pnas.1202366109.
  16. Deenick, E. K. and Tangye, S. G. (2007) 'Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation', *Immunology & Cell Biology*, 85(7), pp. 503–505. doi: 10.1038/sj.icb.7100114.
  17. Dixon, S. J. *et al.* (2012) 'Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death', *Cell*, 149(5), pp. 1060–1072. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
  18. Dominguez-Villar, M. and Hafler, D. A. (2018) 'Regulatory T cells in autoimmune disease', *Nature Immunology*, 19(7), pp. 665–673. doi: 10.1038/s41590-018-0120-4.
  19. Elmore, S. (2007) 'Apoptosis: a review of programmed cell death.', *Toxicologic pathology*, 35(4), pp. 495–516. doi: 10.1080/01926230701320337.
  20. Elojeimy, S. *et al.* (2006) 'New insights on the use of desipramine as an inhibitor for acid ceramidase', *FEBS Letters*, 580(19), pp. 4751–4756. doi: 10.1016/j.febslet.2006.07.071.
  21. Fletcher, J. M. *et al.* (2009) 'CD39 + Foxp3 + Regulatory T Cells Suppress Pathogenic Th17 Cells and Are Impaired in Multiple Sclerosis', *The Journal of Immunology*, 183(11), pp. 7602–7610. doi: 10.4049/jimmunol.0901881.
  22. Gulbins, E. *et al.* (2013) 'Acid sphingomyelinase – ceramide system mediates effects of antidepressant drugs', 19(7), pp. 2–9. doi: 10.1038/nm.3214.
  23. Gulbins, E. *et al.* (2015) 'A central role for the acid sphingomyelinase/ceramide system in neurogenesis and major depression', *Journal of Neurochemistry*, 134(2), pp. 183–192. doi: 10.1111/jnc.13145.
  24. Heinrich, M. *et al.* (1999) 'Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide.', *The EMBO journal*, 18(19), pp. 5252–63. doi:

- 10.1093/emboj/18.19.5252.
25. Herold, G. (2017) *Innere Medizin*. Köln.
26. *HIF-1 $\alpha$  pathway* | Abcam (no date). Available at:  
[https://www.abcam.com/pathways/hif-1alpha-pathway?gclid=Cj0KCQjw7qn1BRDqARIsAKMbHDaSJVLUbQatF8s5x7FBwQ0zmxulqgmcPlz4csyFICx2\\_S5TeJn3CUcaAhq9EALw\\_wcB&gclidsrc=aw.ds](https://www.abcam.com/pathways/hif-1alpha-pathway?gclid=Cj0KCQjw7qn1BRDqARIsAKMbHDaSJVLUbQatF8s5x7FBwQ0zmxulqgmcPlz4csyFICx2_S5TeJn3CUcaAhq9EALw_wcB&gclidsrc=aw.ds)  
(Accessed: 30 April 2020).
27. Höfer, T., Krichevsky, O. and Altan-Bonnet, G. (2012) 'Competition for IL-2 between Regulatory and Effector T Cells to Chisel Immune Responses', *Frontiers in Immunology*, 3(SEP), p. 268. doi: 10.3389/fimmu.2012.00268.
28. Hofmeister, R. *et al.* (1997) 'Activation of acid sphingomyelinase by interleukin-1 (IL-1) requires the IL-1 receptor accessory protein', *ASBMB*. Available at: <http://www.jbc.org/content/272/44/27730.short> (Accessed: 14 June 2019).
29. Hollmann, C. *et al.* (2016) 'Inhibition of Acid Sphingomyelinase Allows for Selective Targeting of CD4 + Conventional versus Foxp3 + Regulatory T Cells', *The Journal of Immunology*, 197(8), pp. 3130–3141. doi: 10.4049/jimmunol.1600691.
30. Hsu, T. S. and Lai, M. Z. (2018) 'Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  plays a predominantly negative role in regulatory T cell functions', *Journal of Leukocyte Biology*. John Wiley and Sons Inc., pp. 911–918. doi: 10.1002/JLB.MR1217-481R.
31. Jiang, X. C. *et al.* (2000) 'Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease.', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(12), pp. 2614–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11116061> (Accessed: 30 May 2019).
32. Jorgensen, I. and Miao, E. A. (2015) 'Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens.', *Immunological reviews*, 265(1), pp. 130–42. doi: 10.1111/imr.12287.
33. Justice, M. J. *et al.* (2018) 'Inhibition of acid sphingomyelinase disrupts LYNUS signaling and triggers autophagy', *Journal of Lipid Research*, 59(4), pp. 596–606. doi: 10.1194/jlr.M080242.
34. Kaltenberg, J. *et al.* (2010) 'Zinc signals promote IL-2-dependent proliferation of T cells', *European Journal of Immunology*, 40(5), pp. 1496–1503. doi: 10.1002/eji.200939574.
35. Karow, T. and Lang-Roth, R. (2017) *Pharmakologie und Toxikologie*. 25th edn.

36. Kerr, G. W., McGuffie, A. C. and Wilkie, S. (2001) 'Tricyclic antidepressant overdose: a review', *Emergency Medicine Journal*, 18(4), pp. 236–241. doi: 10.1136/emj.18.4.236.
37. Kirkegaard, T. *et al.* (2010) 'Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann–Pick disease-associated lysosomal pathology', *Nature*, 463(7280), pp. 549–553. doi: 10.1038/nature08710.
38. Kirschnek, S. (2000) 'CD95-mediated apoptosis in vivo requires acid sphingomyelinase', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M002957200.
39. Klutzny, S. *et al.* (2017) 'Functional inhibition of acid sphingomyelinase by Fluphenazine triggers hypoxia-specific tumor cell death', *Cell Death and Disease*, 8(3), pp. 1–15. doi: 10.1038/cddis.2017.130.
40. Kölzer, M., Werth, N. and Sandhoff, K. (2004) 'Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine', *FEBS Letters*, 559(1–3), pp. 96–98. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00033-X.
41. Koreth, J. *et al.* (2011) 'Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease.', *The New England journal of medicine*, 365(22), pp. 2055–66. doi: 10.1056/NEJMoa1108188.
42. Kornhuber, J. *et al.* (2005) 'High activity of acid sphingomyelinase in major depression', *Journal of Neural Transmission*, 112(11), pp. 1583–1590. doi: 10.1007/s00702-005-0374-5.
43. Kornhuber, J. *et al.* (2008) 'Identification of New Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase Using a Structure–Property–Activity Relation Model', *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(2), pp. 219–237. doi: 10.1021/jm070524a.
44. Kornhuber, J. *et al.* (2009) 'The role of ceramide in major depressive disorder', *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 259(S2), pp. 199–204. doi: 10.1007/s00406-009-0061-x.
45. Kornhuber, J. *et al.* (2013) 'Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMAs)', in, pp. 169–186. doi: 10.1007/978-3-7091-1368-4\_9.
46. Krönke, M. (1999) 'Biophysics of ceramide signaling: Interaction with proteins and phase transition of membranes', *Chemistry and Physics of Lipids*. doi: 10.1016/S0009-3084(99)00059-6.
47. Kurz, J. *et al.* (2019) 'Ceramides as Novel Disease Biomarkers', *Trends in Molecular Medicine*, 25(1), pp. 20–32. doi: 10.1016/J.MOLMED.2018.10.009.



48. Lemasters, J. J. *et al.* (1998) 'Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy', *BioFactors*. IOS Press, pp. 283–285. doi: 10.1002/biof.5520080316.
49. Li, Y. *et al.* (2010) 'Altered expression of CD4+CD25+ regulatory T cells and its 5-HT1a receptor in patients with major depression disorder', *Journal of Affective Disorders*, 124(1–2), pp. 68–75. doi: 10.1016/j.jad.2009.10.018.
50. Lidove, O. *et al.* (2017) 'Déficit en sphingomyélinase acide (maladie de Niemann-Pick B) : une étude rétrospective multicentrique de 28 patients adultes', *Revue de Medecine Interne*, 38(5), pp. 291–299. doi: 10.1016/j.revmed.2016.10.387.
51. Lumsden, E. W. *et al.* (2019) 'Antidepressant-relevant concentrations of the ketamine metabolite (2 R,6 R)-hydroxynorketamine do not block NMDA receptor function', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(11), pp. 5160–5169. doi: 10.1073/pnas.1816071116.
52. Magtanong, L. and Dixon, S. J. (2020) *Der Ferroptose-Signalweg: Struktur, Funktion, und Modulation*, 02.11.2020. Available at: <https://www.biomol.com/de/ressourcen/biomol-blog/der-ferroptose-signalweg-struktur-funktion-und-modulation> (Accessed: 4 January 2021).
53. Mahmud, S. A., Manlove, L. S. and Farrar, M. A. (2013) 'Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function', *JAK-STAT*, 2(1). doi: 10.4161/JKST.23154.
54. Maurer, B. *et al.* (2020) 'High activation of STAT5A drives peripheral T-cell lymphoma and leukemia', *Haematologica*, 105(2), pp. 435–447. doi: 10.3324/haematol.2019.216986.
55. Mitsonis, C. I. *et al.* (2010) 'Effects of escitalopram on stress-related relapses in women with multiple sclerosis: An open-label, randomized, controlled, one-year follow-up study', *European Neuropsychopharmacology*, 20(2), pp. 123–131. doi: 10.1016/j.euroneuro.2009.10.004.
56. Mostert, J. P. *et al.* (2008) 'Effects of fluoxetine on disease activity in relapsing multiple sclerosis: a double-blind, placebo-controlled, exploratory study', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 79(9), pp. 1027–1031. doi: 10.1136/jnnp.2007.139345.
57. Murphy, K. and Weaver, C. (2018) *Janeway Immunologie*. 9th edn. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-662-56004-4.
58. Neumann, J. (2008) *Immunbiologie*. Edited by J. Neumann. Berlin, Heidelberg:

- Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch). doi: 10.1007/978-3-540-72569-5.
59. Novgorodov, S. A. *et al.* (2018) 'Acid sphingomyelinase promotes mitochondrial dysfunction due to glutamate-induced regulated necrosis', *Journal of Lipid Research*, 59(2), pp. 312–329. doi: 10.1194/jlr.M080374.
  60. Paterson, A. M. *et al.* (2015) 'Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity.', *The Journal of experimental medicine*, 212(10), pp. 1603–21. doi: 10.1084/jem.20141030.
  61. Peng, S. L. (2008) 'Foxo in the immune system', *Oncogene*, pp. 2337–2344. doi: 10.1038/onc.2008.26.
  62. Percy, M. J. *et al.* (2008) 'A Gain-of-Function Mutation in the HIF2A Gene in Familial Erythrocytosis', *New England Journal of Medicine*, 358(2), pp. 162–168. doi: 10.1056/NEJMoa073123.
  63. Petersen, N. H. T. *et al.* (2013) 'Transformation-associated changes in sphingolipid metabolism sensitize cells to lysosomal cell death induced by inhibitors of acid sphingomyelinase.', *Cancer cell*, 24(3), pp. 379–93. doi: 10.1016/j.ccr.2013.08.003.
  64. Pierzyńska-Mach, A., Janowski, P. A. and Dobrucki, J. W. (2014) 'Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles', *Cytometry Part A*, 85(8), pp. 729–737. doi: 10.1002/cyto.a.22495.
  65. Qureshi, O. S. *et al.* (2011) 'Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4', *Science*, 332(6029), pp. 600–603. doi: 10.1126/science.1202947.
  66. Repnik, U. *et al.* (2012) 'Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1824(1), pp. 22–33. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.08.016.
  67. Rook, G. A. W. and Lowry, C. A. (2008) 'The hygiene hypothesis and psychiatric disorders', *Trends in Immunology*, 29(4), pp. 150–158. doi: 10.1016/j.it.2008.01.002.
  68. Roth, A. G. *et al.* (2009) 'Potent and Selective Inhibition of Acid Sphingomyelinase by Bisphosphonates', *Angewandte Chemie International Edition*, 48(41), pp. 7560–7563. doi: 10.1002/anie.200903288.
  69. Sakaguchi, S. *et al.* (2006) 'Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease', *Immunological Reviews*,

- 212(1), pp. 8–27. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x.
70. Schissel, S. L. *et al.* (1998) 'The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene', *Journal of Biological Chemistry*, 273(29), pp. 18250–18259. doi: 10.1074/jbc.273.29.18250.
71. Schneider-Schaulies, J. and Beyersdorf, N. (2018) 'CD4+Foxp3+regulatory T cell-mediated immunomodulation by anti-depressants inhibiting acid sphingomyelinase', *Biological Chemistry*, 399(10), pp. 1175–1182. doi: 10.1515/hsz-2018-0159.
72. Schneider-Schaulies, J. and Schneider-Schaulies, S. (2015) 'Sphingolipids in viral infection', *Biological Chemistry*, 396(6–7), pp. 585–595. doi: 10.1515/hsz-2014-0273.
73. Ségui, B. *et al.* (2006) 'Sphingolipids as modulators of cancer cell death: Potential therapeutic targets', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(12), pp. 2104–2120. doi: 10.1016/J.BBAMEM.2006.05.024.
74. Settembre, C. *et al.* (2013) 'Signals from the lysosome: A control centre for cellular clearance and energy metabolism', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. NIH Public Access, pp. 283–296. doi: 10.1038/nrm3565.
75. Shah, R., Shchepinov, M. S. and Pratt, D. A. (2018) 'Resolving the Role of Lipxygenases in the Initiation and Execution of Ferroptosis', *ACS Central Science*, 4(3), pp. 387–396. doi: 10.1021/acscentsci.7b00589.
76. Singh, Y. *et al.* (2016) 'Prolyl hydroxylase 3 (PHD3) expression augments the development of regulatory T cells', *Molecular Immunology*, 76, pp. 7–12. doi: 10.1016/j.molimm.2016.06.003.
77. Slee, E. A. *et al.* (1996) 'Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32.', *The Biochemical journal*, 315 ( Pt 1(Pt 1)), pp. 21–4. doi: 10.1042/bj3150021.
78. Stahl, M. *et al.* (2002) 'The Forkhead Transcription Factor FoxO Regulates Transcription of p27 Kip1 and Bim in Response to IL-2', *The Journal of Immunology*, 168(10), pp. 5024–5031. doi: 10.4049/jimmunol.168.10.5024.
79. Tharkeshwar, A. K. *et al.* (2017) 'A novel approach to analyze lysosomal dysfunctions through subcellular proteomics and lipidomics: the case of NPC1 deficiency', *Scientific Reports*, 7(1), p. 41408. doi: 10.1038/srep41408.

80. Thomé, M. P. *et al.* (2016) 'Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy', *Journal of Cell Science*, 129(24), pp. 4622–4632. doi: 10.1242/jcs.195057.
81. *Trizyklische Antidepressiva - DocCheck Flexikon* (2019). Available at: [https://flexikon.doccheck.com/de/Trizyklische\\_Antidepressiva#Anwendung](https://flexikon.doccheck.com/de/Trizyklische_Antidepressiva#Anwendung) (Accessed: 8 December 2019).
82. Vignali, D. A. A., Collison, L. W. and Workman, C. J. (2008) 'How regulatory T cells work', *Nature Reviews Immunology*, pp. 523–532. doi: 10.1038/nri2343.
83. Villarino, A. V., Kanno, Y. and O'Shea, J. J. (2017) 'Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system', *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 374–384. doi: 10.1038/ni.3691.
84. Wang, F., Gómez-Sintes, R. and Boya, P. (2018) 'Lysosomal membrane permeabilization and cell death', *Traffic*, 19(12), pp. 918–931. doi: 10.1111/tra.12613.
85. Wheeler, S. *et al.* (2019) 'Cytosolic glucosylceramide regulates endolysosomal function in Niemann-Pick type C disease', *Neurobiology of Disease*, 127, pp. 242–252. doi: 10.1016/j.nbd.2019.03.005.
86. Zhang, X. *et al.* (2011) 'Akt, FoxO and regulation of apoptosis', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.03.010.
87. Zhou, Y. *et al.* (2016) 'Acid Sphingomyelinase (ASM) is a Negative Regulator of Regulatory T Cell (Treg) Development', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(3), pp. 985–995. doi: 10.1159/000447806.

## 10 Appendix

### I. Abkürzungsverzeichnis

AO	Acridin Orange
APC	Antigen präsentierende Zelle
Asm	Saure Sphingomyelinase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
BSS	Balanced Salt Solution
CD	Cluster of differentiation
COPD	Chronic obstructive pulmonal disease
CTSB	Cathepsin B
CTSD	Cathepsin D
C1P	Ceramid-1-Phosphat
DMOG	Dimethyloxaloylglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FoxO	Forkhead-Box-Protein O
GPX4	Glutathionhydroperoxidase 4
HIF	Hypoxie inducible factor
HRP	Meerrettichperoxidase
Hsp	Heat shock protein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
LMP	Lysosomale Membranpermeabilität
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
MAO	Monoaminoxidase
MHC	Major Histocompatibility Complex
MS	Multiple Sklerose
NKT	Natürliche Killer T-Zellen
NaCl	Natriumchlorid
Nsm	Neutrale Sphingomyelinase

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PHD3	Prolyl-Hydroxylase 3
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SMAC	Supramolecular activation complexes
SNRI	Serotonin-Noradrenalin-Reuptake-Inhibitor
SSRI	Selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitoren
STAT	Signal Transducer and Activators of Transcription
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
TCR	T-Zell-Rezeptor
Tconv	konventionelle T-Zellen
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
Treg	regulatorische T-Zellen
TZA	Trizyklische Antidepressiva
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	wildtypisch
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
5-HT	5-Hydroxytryptophan = Serotonin

## II. **Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1: Angeborenes und erworbenes Immunsystem ..... 2
- Abbildung 2: Schematische Darstellung von Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptor ..... 4
- Abbildung 3: Sphingolipid-Metabolismus ..... 8
- Abbildung 4: Zusammenhang zwischen ASM-Inhibition und HIF-1 $\alpha$  Aktivierung in vitro ..... 16
- Abbildung 5: Anstieg der Treg-Frequenz nach in vitro Behandlung von Lymphozyten mit den Asm-Inhibitor Desipramin und Sertralin (jeweils 0; 1; 2; 5 und 10  $\mu$ M) ..... 29
- Abbildung 6: Fehlende Frequenzsteigerung von Treg-Zellen nach in vitro Behandlung mit dem Asm-Inhibitor ARC39 (jeweils 0; 1; 2 und 5  $\mu$ M) ..... 31
- Abbildung 7: STAT5 schützt T-Zellen nicht vor dem Zelltod ..... 33
- Abbildung 8: Inkubation muriner Lymphozyten mit dem Pan-Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK ..... 34
- Abbildung 9: Hypoxie beeinflusst die Stressantwort auf erhöhte Sphingomyelinakkumulation..... 35
- Abbildung 10: Inkubation von Lymphozyten aus CD4Cre HIF-1 $\alpha$  flox/flox Mäusen mit Desipramin und IL-2 ..... 37
- Abbildung 11: Inkubation von murinen Lymphozyten mit DMOG und Desipramin..... 38
- Abbildung 12: Der Cathepsin-Inhibitor CA074 reduziert das Asm-Inhibitor-assoziierte Sterben konventioneller T-Zellen nach in vitro Behandlung mit Desipramin..... 40
- Abbildung 13: Exemplarischer Immunoblot von CD4+ T-Zellen nach Inkubation mit Desipramin ..... 42
- Abbildung 14: Desipramin- und lichtinduzierter Ausstrom von Acridin-Orange Molekülen aus den Lysosomen..... 43
- Abbildung 15: Färbung von CTLL2 Zellen mit Acridin Orange mit und ohne Desipramin-Behandlung ..... 45
- Abbildung 15 (Fortsetzung): Färbung von CTLL2 Zellen mit Acridin Orange mit und ohne Desipramin-Behandlung ..... 46
- Abbildung 16: IL-2 schützt regulatorische T-Zellen durch Phosphorylierung von FoxO3 vor dem Zelltod ..... 53

### **III. Tabellenverzeichnis**

- Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Inhibitoren..... 17
- Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antikörper ..... 17
- Tabelle 3: Übersicht über verwendete Westernblot-Antikörper..... 18
- Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Lösungen und Reagenzien..... 20
- Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Farbstoffe und Kits ..... 20



## IV. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die mich während der Zeit meiner Promotion inhaltlich beraten und unterstützt haben und mir stets Beistand leisteten.

Ein besonderer Dank geht an meine Betreuer Prof. Jürgen Schneider-Schaulies und Niklas Beyersdorf sowie Prof. Alexandra Schubert-Unkmeir. Ich habe mich zu jeder Zeit der Promotion optimal unterstützt gefühlt. Sie hatten stets die passende Antwort auf meine Fragen, haben mich gefordert und gefördert. Obwohl jeder Anfang schwer ist, gerade wenn man als unerfahrener Mediziner ins kalte Laborwasser geworfen wird, gelang es ihnen, ein I-Dötzchen in Sachen Laborerfahrung zumindest soweit zu erziehen, dass er sich nicht selbst gefährdet. Meine Motivation diese experimentelle Doktorarbeit anzutreten bestand darin einmal hinter die Kulissen der Lehrbücher und wissenschaftlichen Artikel zu schauen. Was bedeutet und wie funktioniert Grundlagenforschung? Welche Methoden werden für die Untersuchung von Zellmechanismen angewandt? Welchen Aufwand benötigt es, um wissenschaftlich valide Erkenntnisse zu sammeln? Welche Vorhänge öffnen sich abseits der Lehrbücher und Leitlinien? Viele dieser Fragen wurden während der Zeit im Labor und der Phase des Schreibens beantwortet.

Einen wesentlichen Anteil an der Durchführung meiner Experimente und der Durchsicht hatte auch Claudia Hollmann, die sich meiner annahm und mich bei sämtlichen Schwierigkeiten in allen Phasen der Promotion tatkräftig, sachkundig und motivierend unterstützte.

Danke auch an das gesamte Team der AG JSS und AG Beyersdorf. Sie waren mein Ansprechpartner im Labor und nahmen mich an die Hand - egal, was es war: Wo steht der Antikörper, wie stelle ich das Gerät ein, welche Fehlerquellen könnte es geben. Ein großes Dankeschön!

Auf eine andere, aber ganz erhebliche Weise unterstützte mich meine Familie, allen voran meine Eltern. Danke für euren Rückhalt, für eure Geduld und ermutigende Zusprüche. Sich darüber hinaus finanziell nicht sorgen zu müssen und sich auf sein Studium und die Promotion konzentrieren zu können, ist nicht selbstverständlich. Auch meiner Tante Iris möchte ich an dieser Stelle ein herzliches Dankeschön für das Redigieren meiner Arbeit ausrichten.

Danke sagen möchte ich zum Schluss auch meiner Freundin Alina, mit der ich Frust, Ärger, Freude und Erwartung geteilt habe und die mich stets auf den Boden der Tatsachen brachte, damit ich mein Ziel nicht aus den Augen verliere.

Ohne euch alle hätte sich mein Weg zur Promotion deutlich schwieriger gestaltet!

DANKE!